



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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO  
PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL GRAXO DO  
BIODIESEL DE TUNGUE E BLENDS COM SOJA  
EMPREGANDO GC-MS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Viviane de Lemos Pardo

**Rio Grande - RS, Brasil  
2010**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO DO PERFIL GRAXO DO BIODIESEL  
DE TUNGUE E BLENDS COM SOJA  
EMPREGANDO GC-MS**

**por**

**Viviane de Lemos Pardo**

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**

Rio Grande, RS, Brasil

**2010**

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

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO DO PERFIL GRAXO DO BIODIESEL  
DE TUNGUE E BLENDS COM SOJA  
EMPREGANDO GC-MS**

elaborada por  
**Viviane de Lemos Pardo**

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

**Comissão Examinadora**

---

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

---

**Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago (URI)**

---

**Prof. Dr. Rosilene Maria Clementin (FURG)**

---

**Prof. Dr. Jaqueline Garda Buffon (FURG)**

Rio Grande, 30 de julho de 2010.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel** pela oportunidade, pela orientação, pelo seu apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos, por acreditar no meu potencial e no meu trabalho, por me proporcionar uma boa formação e pela amizade demonstrada. Obrigada por tudo!

A **Prof. Dr<sup>a</sup>. Rosilene Maria Clementin** pela participação e sugestões no exame de qualificação e na defesa da dissertação, pelos ensinamentos enquanto professora e co-orientadora e pelas suas valiosas sugestões para o final deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago** pela participação na defesa da dissertação e pelas suas valiosas sugestões para o final deste estudo.

A **Prof. Dr<sup>a</sup>. Jaqueline Garda Buffon** pelas sugestões durante o desenvolvimento do trabalho e pela disposição em participar do exame de qualificação e defesa da dissertação, suas sugestões contribuíram muito para o final deste estudo.

A **Dr<sup>a</sup>. Márcia Helena Scherer Kurz** pelas valiosas contribuições no decorrer do meu trabalho e por todos os ensinamentos compartilhados durante o acompanhamento nos cromatógrafos. Muito obrigada!!!

Aos meus pais, **José Luis e Sylvia**, por acreditarem sempre em minha capacidade, por me proporcionarem sempre o melhor que podiam, pelo amor, pelo apoio, pela educação e valores ensinados. Pai e mãe, obrigada por tudo. Amo muito vocês!!!

Aos meus avós e padrinhos, **Darcy e Sirlei**, duas pessoas especiais na minha vida, por serem a minha estrutura, o meu porto-seguro, pelo carinho, dedicação e amor incondicional, por toda ajuda concedida a mim e ao Gui, enfim palavras não seriam o suficiente para descrever todo agradecimento que tenho por vocês.

Ao meu filho, **Guilherme**, pelo seu amor, sorriso e carinho que faz os meus dias mais felizes, pelos abraços e beijinhos que me dá quando quer minha atenção,

por entender quando preciso estar ausente. Meu filho, podes ter certeza que és a coisa mais importante na minha vida, e que todo empenho é por nós!!!

Ao meu irmão, **Jeferson**, que apesar da distância sempre torce por mim e pelo apoio incondicional. Te amo mano!!!

Ao meu namorado, **Rafael**, pelo carinho, amor e dedicação, por estar sempre ao meu lado, por compreender minha ausência e mau-humor em muitos momentos. Por acreditar em meu potencial e me dar muita força quando os problemas apareciam. Rafa, te amo!!!!

Aos meus tios e tias, **Sérgio, Silvana, Sinval, Paulinho, Nina, Paulo, Chrystian e Paolla**, pelo incentivo, pelo carinho, por acreditarem e torcerem muito por mim, pela ajuda financeira (sempre necessária) e por todos os momentos em família que me dão a certeza que nasci na família certa.

Aos meus familiares, que sempre torceram por mim e apostaram em mais uma vitória e que direta ou indiretamente fizeram parte dela!!!

Aos meus sogros e cunhada, **Paschoal, Tânia e Cris**, pelo incentivo, pelo apoio e carinho, em especial pela ajuda e pelo carinho dedicado ao meu filho enquanto estou ausente. À vocês o meu sincero agradecimento!!

A todos os meus amigos, que sempre me proporcionam momentos de descontração e torcem por mim. Em especial a minha grande amiga, **Fabi**, minha amiga de todas as horas, e de todos os momentos. Obrigada pela forma alegre e agradável que compartilhamos cada uma das nossas vitórias.

As minhas queridas amigas, **Sergi e Adri**, por todo apoio, pela disposição em ajudar sempre, pelas discussões químicas, pela compreensão e pelas palavras de incentivo. A vocês, o meu muito obrigado!!!!

Aos colegas do LACOM, **Márcia, Jaque, Sherol, Sergi, Liziará, Débora, Liziane, Maicon, Adri Demoliner, Adri Dias, Ana Laura, Ednei, Fábio, Luis, Maristela, Cátia, Nathiele, Fabi, Augusto, Maria Angelis, Bruno, e Patrícia**, com os quais convivi, e que contribuíram de diversas formas, tenho um enorme carinho por todos.

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

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

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

À **CAPES** por me oportunizar a bolsa 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**, pela proteção e por me conceder mais esta vitória.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental  
Universidade Federal do Rio Grande – FURG  
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO  
PERFIL GRAXO DO BIODIESEL DE TUNGUE E BLENDA COM SOJA  
EMPREGANDO GC-MS  
AUTORA: VIVIANE DE LEMOS PARDO  
ORIENTADOR: PROF. Dr. EDNEI GILBERTO PRIMEL  
Rio Grande, 30 de julho de 2010.

No Brasil o biodiesel é utilizado em misturas com óleo diesel em proporções de 5%, sem que haja modificações nos motores. Com o intuito de diversificar a utilização de oleaginosas não comestíveis no ramo dos biocombustíveis, e ainda vincular a produção com agricultura sustentável, uma alternativa para o RS é a utilização do óleo de tungue para a produção de biodiesel. A caracterização e quantificação de ácidos graxos do biodiesel de tungue, torna-se importante devido à seu exclusivo perfil graxo. Neste trabalho, foi estudado o desenvolvimento e validação de método para a determinação do perfil graxo do biodiesel metílico de tungue e blendas com soja utilizando GC-MS. Os parâmetros de validação considerados foram: curva analítica, linearidade, seletividade, limite de detecção e quantificação, robustez, precisão e exatidão. Para determinar as melhores condições cromatográficas, foram testadas diferentes programações de temperatura no forno cromatográfico; fluxo de gás; temperatura do injetor, detector e interface; e modo de injeção. As condições do GC-MS após a otimização foram: injeção de 1  $\mu\text{L}$  com injeção em alta pressão (300 kPa), T do injetor: 250  $^{\circ}\text{C}$ , injeção split 1:30, fluxo de 1  $\text{mL min}^{-1}$ , coluna Rtx-5MS com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ , T forno: isoterma de 2 min a 130  $^{\circ}\text{C}$ , aumento de 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 220  $^{\circ}\text{C}$ , aumento de 0,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 223 $^{\circ}\text{C}$ , aumento de 7  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 250  $^{\circ}\text{C}$  e isoterma em 250  $^{\circ}\text{C}$  por 3 min, resultando em 20 min de análise. A temperatura da fonte e interface foram de 200  $^{\circ}\text{C}$  e 250  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, com o MS no modo *full scan*, ionização por impacto eletrônico a 70 eV, e intervalo de massas de 30 a 500 u.m.a. A identificação do  $\alpha$ -eleosteárico foi baseada na fragmentação característica do composto, pela comparação com o espectro do ácido linolênico, e ainda pelo tempo de retenção do composto. Na validação, as curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,99. O LD e LQ foram adequados, permitindo a quantificação de ésteres na concentração mínima de 0,6%. Os valores de exatidão ficaram entre 86 e 117%, com RSD% menores que 8%. O efeito matriz também foi avaliado, sendo que esse efeito foi considerado médio para a maioria dos compostos, ficando entre  $\pm 20$  e 50%. Durante a aplicação do método, o mesmo se mostrou adequado para amostras de biodiesel metílico de tungue e blendas com soja, nas proporções de 15:85, 20:80 e 25:75 (T:S, v/v). A aplicabilidade do método também foi testada para o biodiesel de soja, obtendo resultados satisfatórios, mostrando-se assim, além de tudo, ser um método robusto.

Palavras-chave: óleo de tungue, validação, GC-MS, blendas, perfil graxo, FAME

## ABSTRACT

Master's Thesis

Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental  
Universidade Federal do Rio Grande

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR THE DETERMINATION OF  
FATTY ACIDS METHYL ESTERS CONTENTS IN TUNG BIODIESEL AND  
BLENDS WITH SOYBEAN USING GC-MS

AUTHOR: VIVIANE DE LEMOS PARDO

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

July 30th, 2010, Rio Grande, RS, Brazil

In Brazil, biodiesel is blended with diesel oil at ratio of 5%, without any modifications to the engines. In order to diversify the use of non-edible oil in the field of biofuels, and to tie production to sustainable agriculture, an alternative to RS is the use of tung oil to produce biodiesel. The characterization and quantification of fatty acids of tung biodiesel, it is important due to its fatty acid profile exclusive. In this work, we studied the development and validation of method for determination of fatty acids methyl esters content in tung biodiesel and blends with soybean using GC-MS. The validation parameters were considered: analytical curve, linearity, selectivity, limit of detection and quantification, robustness, precision and accuracy. To determine the best chromatographic conditions were tested at different temperature settings chromatographic oven, gas flow, temperature of injector, detector and interface, and method of injection. The conditions of GC-MS after the optimization were: injection of 1  $\mu\text{L}$  injected at high pressure (300 kPa), T injector: 250 °C, split injection 1:30, flow rate of 1  $\text{mL min}^{-1}$ , column RTX-5MS with dimensions 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ , T oven: isothermal for 2 min at 130 °C, an increase of 20 °C / min up to 220 °C, an increase of 0.5 °C / min up to 223 °C, an increase of 7 °C / min up to 250 °C and isothermal at 250 °C for 3 min, resulting in 20 min of analysis. The source temperature and interface were 200 °C and 250 °C, respectively, with the MS in *full scan* mode, electron impact ionization at 70 eV and mass range 30-500 amu. The identification of  $\alpha$ -eleostearic was based on characteristic fragmentation of the compound, by comparison with the spectrum of linolenic acid, and also by the retention time of the compound. For validation, the standard curves showed r values greater than 0.99. The LD and LQ were adequate, allowing the quantification of esters in the minimum concentration of 0.6%. The values of accuracy were between 86 and 117%, with RSD% less than 8%. The matrix effect was also evaluated, and this effect was considered average for most compounds, to between  $\pm 20$  and 50%. During the application of the method, it was adequate for samples of tung biodiesel and blends tung and soybean biodiesel in the proportions 15:85, 20:80 and 25:75 (T: S, v / v). The applicability of the method was also tested for soybean biodiesel, obtaining satisfactory results, proving to be so, above all, be a robust method.

Key words: tung oil, validation, GC-MS, blends, fatty acid profile, FAME

## Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura química de um dos componentes da mistura do diesel .....	6
Figura 2 – Estrutura química de um dos componentes da mistura do biodiesel .....	6
Figura 3 – Produção de biodiesel no Brasil de 03/2005 a 04/2010 (FONTE: ANP, 2010). .....	9
Figura 4 – Produção de biodiesel no rio Grande do Sul comparando os quatro primeiros meses de 2008 a 2010 .....	10
Figura 5 – Reações envolvidas na transesterificação de triglicerídeos (FONTE: SUAREZ <i>et al.</i> , 2007a).....	13
Figura 6 – Percentual de matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel - Brasil - 2009 (FONTE: ANP, 2010) .....	16
Figura 7 – Árvore do tungue, frutos e sementes .....	18
Figura 8 – Estrutura do ácido $\alpha$ -eleosteárico.....	20
Figura 9 – Componentes básicos de um cromatógrafo a gás .....	27
Figura 10 – Componentes básicos de um espectrômetro de massas .....	30
Figura 11 – Modelo de curva utilizado no método de adição de padrão .....	47
Figura 12 – Comparação dos cromatogramas obtidos pela programação isotérmica do forno a 200 °C (preto) e pela programação de temperatura otimizada (rosa), destacando a separação dos três compostos que coeluem.....	51
Figura 13 – Cromatogramas com diferentes fluxos de gás de arraste: em preto 1,0 mL min <sup>-1</sup> , em azul 0,8 mL min <sup>-1</sup> e em rosa 0,6 mL min <sup>-1</sup> .....	53
Figura 14 – Cromatogramas com diferentes temperaturas de injeção: 200 °C (rosa), 250 °C (preto) e 280 °C (azul) .....	54
Figura 15 – Testes com injeção a alta pressão (em preto) e sem alta pressão (em rosa).....	55
Figura 16 – Testes com diferentes temperaturas da interface: em rosa 280 °C e em preto 250 °C .....	56
Figura 17 – Cromatograma dos testes para otimização da temperatura da fonte de ionização: 280 °C (marrom), 260°C (azul), 230 °C (rosa) e 200 °C (preto).....	57
Figura 18 – Cromatograma da mistura de padrões M8 com as melhores condições cromatográficas para o método.....	58

Figura 19 – Espectros de massas dos ésteres obtido no modo scan : (a) oléico, (b) linoléico, (c) linolênico e (d) $\alpha$ -eleosteárico .....	61
Figura 20 – Formação do íon tropílio .....	62
Figura 21 – Curvas analíticas do hexadecanoato de metila no solvente e na matriz	67
Figura 22 – Curvas analíticas do octadecanoato de metila no solvente e na matriz	67
Figura 23 – Curvas analíticas do octadecenoato de metila no solvente e na matriz	68
Figura 24 – Curvas analíticas do linoleato de metila no solvente e na matriz .....	68
Figura 25 – Curvas analíticas do linolenato de metila no solvente e na matriz .....	69
Figura 26 – Curvas analíticas do heneicosanoato de metila no solvente e na matriz .....	69
Figura 27 – Curvas analíticas do eicosenoato de metila no solvente e na matriz .....	70
Figura 28 – Curvas analíticas do docosanoato de metila no solvente e na matriz .....	70
Figura 29 – Cromatograma do perfil graxo do biodiesel metílico de tungue (B100), com tempo de retenção e identificação de cada composto.....	72
Figura 30 – Cromatograma do perfil graxo da mistura de biodiesel metílico de tungue e soja na proporção 15:85 (v/v).....	74
Figura 31 – Cromatograma do perfil graxo da mistura de biodiesel metílico de tungue e soja na proporção 20:80 (v/v).....	75
Figura 32 – Cromatograma do perfil graxo da mistura de biodiesel metílico de tungue e soja na proporção 25:75 (v/v).....	75
Figura 33 – Cromatograma do perfil graxo do biodiesel metílico de soja (B100) .....	76

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Características físico-químicas do óleo diesel de alguns óleos vegetais e seus respectivos biodieseis.....	12
Tabela 2 – Ácidos graxos presentes no óleo de tungue (FONTE: AOCS).....	19
Tabela 3 – Composição dos ácidos graxos do óleo de tungue (FONTE: PARK <i>et al.</i> , 2008).....	19
Tabela 4 – Testes com diferentes programações do forno cromatográfico.....	52
Tabela 5 – Condições cromatográficas otimizadas pra o método utilizando GC-MS 57	
Tabela 6 – Programação da temperatura do forno cromatográfico otimizada.....	58
Tabela 7 – Resultados obtidos para calibração dos ésteres graxos.....	59
Tabela 8 – Valores de tempo de retenção e desvio padrão relativo ( $RSD_{tr}\%$ ) para cada composto.....	63
Tabela 9 – Resultados de LD e LQ do método para os compostos em estudo.....	64
Tabela 10 – Precisão instrumental ( $RSD\%$ ) – repetitividade ( $n = 10$ ) e precisão intermediária ( $n = 9$ ).....	65
Tabela 11 – Exatidão (%) e $RSD$ (%) do método para os compostos em estudo a partir dos ensaios de adição de padrão.....	66
Tabela 12 – Efeito matriz para os compostos calculado a partir das inclinações das curvas analíticas no solvente e na matriz.....	71
Tabela 13 – Percentual de ésteres graxos do biodiesel de tungue a partir do método proposto.....	73
Tabela 14 – Quadro comparativo do perfil graxo do biodiesel de tungue, soja e blendas tungue:soja em diferentes proporções.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- AG – ácidos graxos
- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASTM – American Society for Testing and Materials
- B2 – mistura contendo 2% em volume de biodiesel em diesel
- B3 – mistura contendo 3% em volume de biodiesel em diesel
- B4 – mistura contendo 4% em volume de biodiesel em diesel
- B5 – mistura contendo 5% em volume de biodiesel em diesel
- B100 – biodiesel puro
- C14 – cadeia linear de hidrocarbonetos com 14 carbonos
- C18 – cadeia linear de hidrocarbonetos com 18 carbonos
- C24 – cadeia linear de hidrocarbonetos com 24 carbonos
- CFPP – ponto de entupimento do filtro à frio, do inglês *cold flow plugging point*
- CNPE – Conselho Nacional de Política Energética
- CV – coeficiente de variação
- d.i. – diâmetro interno
- DAD – Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detection*
- ECD – Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detector*
- ELSD – detector por dispersão de luz por evaporação, do inglês *Evaporative Light Scattering Detector*
- EN – European Standard
- eV – elétron-Volt
- FAME – ésteres metílicos de ácidos graxos, do inglês, *fatty acids methyl esters*
- FID – Detecção por Ionização em Chama, do inglês *Flame Ionization Detection*
- FPD – Detector Fotométrico de Chama, do inglês *Flame Photometric Detector*

FURG – Universidade Federal do Rio Grande

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

KOH – hidróxido de potássio

LACOM – Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography* LD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

M8 + PI – mistura de oito ésteres metílicos de ácidos graxos (hexadecanoato de metila, octadecanoato de metila, octadecenoato de metila, linoleato de metila, linolenato de metila, heneicosanoato de metila, eicosenoato de metila, docosanoato de metila) mais o padrão interno (tricosanoato de metila)

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MME – Ministério de Minas e Energia

$m/z$  – razão massa-por-carga

NaOH – hidróxido de sódio

NC – número de carbono

NPD – Detecção de Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detection*

OCI – injetor *on-column*

Pa – Pascal (unidade de pressão)

PNPB – Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel

PROÁLCOOL – Programa Nacional do Álcool

PTFE – politetrafluoretileno

$r$  – coeficiente de *Pearson*

RID – detector por índice de refração, do inglês *Refractive Index Detector*

RS – Rio Grande do Sul

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

$RSD_{pi}$  – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

$RSD_r$  – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

$s$  – estimativa do desvio padrão absoluto

SIM – Monitoramento do Íon Seleccionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

$s/n$  – relação sinal-ruído

SFC – cromatografia com fluído supercrítico, do inglês *Supercritical Fluid Chromatography*

t – toneladas

$t_R$  – tempo de retenção

TAG – triacilgliceróis

TCD – Detecção por Condutividade Térmica, do inglês *Thermal Conductivity Detection*

TID – Detector Termoiônico, do inglês *Thermionic Ionization Detector*

UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*

UV – Detecção no Ultravioleta, do inglês *Ultraviolet Detector*

v/v – volume por volume

$x_m$  – 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>Biodiesel.....</b>	<b>5</b>
3.1.1	Histórico do biodiesel no mundo e atual perspectivas no Brasil .....	7
3.1.2	Propriedades dos ácidos graxos e procesos para produção do biodiesel ....	10
3.1.3	Principais matérias-primas.....	14
3.1.4	Tungue.....	17
3.1.5	Influência da composição dos ácidos graxos sobre algumas propriedades do biodiesel .....	21
<b>3.2</b>	<b>Métodos de referência para análise de FAME's.....</b>	<b>23</b>
3.2.1	Outros métodos para análise de FAME's .....	24
<b>3.3</b>	<b>Cromatografia .....</b>	<b>25</b>
3.3.1	Cromatografia Gasosa.....	26
3.3.2	Espectrometria de Massas.....	28
<b>3.4</b>	<b>Validação de Métodos Cromatográficos.....</b>	<b>30</b>
3.4.1	Curva analítica e linearidade.....	32
3.4.1.1	Padronização Interna.....	33
3.4.2	Seletividade .....	33
3.4.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	35
3.4.4	Precisão .....	36
3.4.5	Exatidão .....	37
3.4.6	Robustez.....	39
<b>3.5</b>	<b>Efeito Matriz.....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Instrumentação .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Reagentes, solventes e materiais.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo das soluções analíticas .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4</b>	<b>Amostras de biodiesel.....</b>	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>Preparo da amostra .....</b>	<b>43</b>
<b>4.6</b>	<b>Otimização do sistema cromatográfico GC-MS .....</b>	<b>43</b>
4.6.1	Programação da temperatura do forno cromatográfico .....	43

4.6.2	Fluxo do gás de arraste .....	44
4.6.3	Temperatura do injetor e modo de injeção .....	44
4.6.4	Temperatura da interface.....	45
4.6.2	Temperatura da fonte de ionização .....	45
<b>4.7</b>	<b>Validação do método .....</b>	<b>45</b>
4.7.1	Curva analítica e linearidade.....	45
4.7.2	Seletividade .....	46
4.7.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	46
4.7.4	Precisão .....	46
4.7.5	Exatidão .....	47
4.7.6	Robustez.....	48
<b>4.8</b>	<b>Avaliação do efeito matriz.....</b>	<b>48</b>
<b>4.9</b>	<b>Aplicação do método.....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Otimização das condições cromatográficas no GC-MS.....</b>	<b>50</b>
5.1.1	Programação da temperatura do forno cromatográfico .....	50
5.1.2	Temperatura do injetor e modo de injeção .....	52
5.1.3	Temperatura do injetor e modo de injeção .....	53
5.1.4	Temperatura da interface.....	55
5.1.5	Temperatura da fonte de ionização .....	<b>Erro! Indicador não definido.56</b>
5.1.6	Resumo das condições cromatográficas otimizadas .....	57
<b>5.2</b>	<b>Validação do método .....</b>	<b>59</b>
5.2.1	Curva analítica e linearidade.....	59
5.2.2	Seletividade .....	59
5.2.3	Limite de Detecção e Limite de Detecção.....	63
5.2.4	Precisão .....	64
5.2.5	Exatidão .....	65
<b>5.3</b>	<b>Efeito matriz .....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Aplicação do método.....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS .....</b>	<b>80</b>
<b>10</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
<b>11</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO .....</b>	<b>89</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A maior parte da energia consumida no mundo é fornecida pelo petróleo, carvão e gás natural. Essas fontes são limitadas e já possuem previsão de esgotamento futuro. Neste contexto, a busca por fontes de energias alternativas e renováveis vêm se destacando a cada dia. Entre essas fontes, as de maior destaque são os biocombustíveis, especialmente biodiesel, que pode ser obtido a partir de óleos vegetais ou gordura animal.

A utilização do biodiesel como combustível vem apresentando potencial promissor. Primeiramente, pela sua contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental. Em seguida, fatores econômicos o destacam como uma fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel, evitando a dependência do petróleo, além de promover o agronegócio, tanto para grandes quanto para pequenos produtores.

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. Por isso, é um país com potencial único na produção de biodiesel. A vantagem da diversidade de culturas de oleaginosas evita a dependência e cria alternativas, principalmente nas épocas de entressafra.

Na produção de biodiesel, apesar da soja estar entre as mais usadas, também são utilizadas mamona, pinhão-mansão, girassol e canola como oleaginosas promissoras no que se refere aos biocombustíveis. Destaca-se também a produção de biodiesel a partir de gordura bovina (sebo), a qual atualmente é a segunda maior fonte de matéria-prima do Brasil, perdendo apenas para a soja.

No Rio Grande do Sul, uma das novas alternativas no mercado de biocombustíveis é o biodiesel obtido do óleo de tungue, que é uma oleaginosa que precisa de clima frio para se desenvolver. As principais vantagens do tungue são o alto potencial de produção de óleo, que tem grande qualidade e rendimento, além de não competir com sua utilização na indústria alimentícia, como no caso da soja, girassol e canola. Outra vantagem é que sua produção se enquadra em um sistema sustentável de agricultura, já que o cultivo não é mecanizado.

No Brasil, a cultura do tungue foi introduzida no início do século XX e no Rio Grande do Sul (RS) pode ser encontrada na serra gaúcha, principalmente nos municípios de Veranópolis e Fagundes Varela. A produtividade do óleo de tungue varia de 300-450 kg ha<sup>-1</sup>. A composição do óleo de tungue varia de acordo com sua origem. Ele geralmente contém mais de 80 % do ácido  $\alpha$ -eleostearico, uma cadeia longa (C18) de ácidos graxos com três ligações duplas conjugadas (nos carbonos 9 cis, 11 trans e 13 trans).

O conhecimento do perfil graxo do biodiesel torna-se importante, uma vez que a composição dos ésteres graxos influencia em algumas propriedades do biodiesel, como: qualidade de ignição, calor de combustão, o ponto de entupimento do filtro a frio, estabilidade à oxidação, viscosidade e lubricidade.

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível (ANP) é o órgão regulamentador no Brasil que estabelece métodos de referência para análise de biodiesel. No caso do teor de ésteres (perfil graxo) a norma indicada é a EN 14103, que utiliza GC-FID para a análise. No entanto, para análises em GC-FID são necessários padrões de cada éster de ácido graxo para confirmar os resultados. Na falta de algum padrão, a espectrometria de massa (MS) assume o papel como uma poderosa ferramenta na elucidação das estruturas.

É importante salientar também que a norma EN 14103 é indicada somente para ésteres compreendidos entre o C14 e C24, e utiliza metil heptadecanoato como padrão interno, ocasionando assim algumas restrições à matrizes que não estejam dentro destes parâmetros.

Portanto, o desenvolvimento de novas metodologias para análise de biodiesel a partir de diferentes matrizes, passa a ser um recurso estratégico e necessário no controle de qualidade do biodiesel, que será agregado ao diesel e posteriormente disponibilizado nos postos de abastecimento. Para tal, faz-se necessária a validação do método analítico desenvolvido. A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados gerados.

No que se refere ao biodiesel de tungue, não há ainda uma metodologia de análise específica, o que é importante, devido ao seu perfil graxo exclusivo. Para análises de blendas de biodiesel também não há uma metodologia disponível.

Por isso deve-se ressaltar a importância desse trabalho, que tem como objetivo desenvolver um método para determinação do perfil graxo do biodiesel de tungue e de blendas com soja, que gere informações confiáveis, reprodutíveis e interpretáveis sobre as amostras de biodiesel de tungue. Ademais, este estudo faz parte de um projeto maior, aprovado em 2009, que está sendo desenvolvido em parceria com a Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e Embrapa de Pelotas, e tem a finalidade de desenvolver tecnologias para o cultivo de tungue na região de clima temperado.

Por fim, este estudo também tem o intuito de colaborar para futuras modificações no método original, para que o mesmo atenda às diferentes matérias-primas existentes no Brasil, como o sebo e a palma, por exemplo.

## 2 OBJETIVOS

### Geral

✓ Otimizar, desenvolver e validar um método para análise do perfil graxo do biodiesel de tungue e blendas de tungue:soja empregando GC-MS

### Específicos

✓ Testar diferentes programações da temperatura do forno cromatográfico; fluxo do gás de arraste; temperatura do injetor, interface, fonte de ionização e detector; modo de injeção e taxas de *split*, a fim de otimizar os parâmetros cromatográficos;

✓ Validar o procedimento analítico avaliando limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), curva analítica e linearidade, precisão, exatidão e seletividade;

✓ Avaliar o efeito matriz na amostra do biodiesel de tungue;

✓ Determinar o perfil graxo do biodiesel de tungue;

✓ Aplicar o método para amostras de biodiesel de tungue e blendas de tungue:soja produzidas no Laboratório de Química Orgânica (KOLBE) da FURG;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biodiesel

A maior parte da energia consumida no mundo é fornecida pelo petróleo, carvão e gás natural. Essas fontes são limitadas e já possuem previsão de esgotamento futuro (REZENDE *et al.*, 2007). A partir desse contexto, atualmente a busca por fontes de energias alternativas e renováveis vem se destacando a cada dia. Entre essas fontes, a de maior destaque são os biocombustíveis, especialmente o biodiesel, que pode ser obtido através de fontes lipídicas renováveis, como óleos vegetais e gordura animal.

O termo biodiesel apresenta várias definições, porém com significados semelhantes, podendo então ser definido, de acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), como “combustível composto por alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais ou gorduras animais” (ANP, 2008). Isso significa que, ao contrário das normas internacionais Comité Européen de Normalisation (CEN) e American Society for Testing and Materials (ASTM), a ANP possibilita o uso de outros álcoois de cadeia curta na produção de biodiesel, por exemplo, o etanol que apresenta vantagens econômicas e ambientais frente ao metanol.

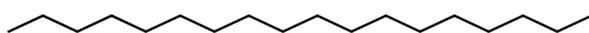
A utilização do biodiesel como combustível vem apresentando potencial promissor. Primeiramente pela sua contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, por ser obtido de fonte renovável, atóxico e livre de enxofre e aromáticos (REZENDE *et al.*, 2007; SINGH & SINGH, 2010). Além disso, possui vantagens físico-químicas, como o alto número de cetano, alto ponto de fulgor (HAAS *et al.*, 2001) e boa lubricidade. (ANASTOPOULOS *et al.*, 2005)

A grande compatibilidade do biodiesel com o diesel convencional o caracteriza como uma alternativa capaz de atender à maior parte da frota de veículos movidos a diesel existentes no mercado, sem a necessidade de adaptação de motores (KUCEC, 2004). Desse modo, pode ser usado puro ou misturado ao óleo

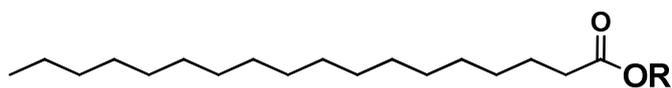
diesel sem qualquer alteração no motor a diesel, na distribuição e infra-estrutura de armazenamento de combustíveis existentes (TAN e VAN GERPEN, 1999). A designação do biodiesel puro é B100 (100% de ésteres de alquila) (FERREIRA *et al.*, 2008). O biodiesel normalmente é utilizado misturado ao óleo diesel conforme a legislação de cada país. A mistura óleo diesel/biodiesel é nomeada, por exemplo, como B5 sendo constituída de 5% de B100 (biodiesel) e 95% de diesel.

As estruturas químicas do óleo diesel e do biodiesel são consideradas similares, conforme ilustram as figuras 1 e 2, entretanto o biodiesel apresenta certa vantagem por possuir oxigênio em sua estrutura, o que facilita o processo de combustão, conduzindo à uma diminuição de emissões de hidrocarbonetos, monóxido de carbono e materiais particulados (ANASTOPOULOS *et al.*, 2005).

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 diesel em virtude da presença do oxigênio em sua cadeia e não é tóxico.



**Figura 1 – Estrutura química de um dos componentes da mistura do diesel**



**Figura 2 – Estrutura química de um dos componentes da mistura do biodiesel**

### 3.1.1 Histórico do biodiesel no mundo e atuais perspectivas no Brasil

*“O uso de óleos vegetais como combustível pode parecer insignificante hoje, mas tais óleos podem se tornar ao longo do tempo, tão importante quanto o petróleo e o carvão de hoje”*

*Rudolf Diesel -1912.*

O uso de óleos vegetais como combustível teve seu início quando Rudolf Diesel apresentou em 1900, na Exposição Universal em Paris, um motor com combustão interna funcionando com óleo de amendoim (SHAY, 1993). Os primeiros motores tipo diesel eram de injeção indireta. Tais motores eram alimentados por petróleo filtrado, óleos vegetais e até mesmo por óleos de peixe.

O primeiro registro do que hoje conhecemos como biodiesel ocorreu no ano de 1937, proposta pelo belga Charles G. Chavanne, que descreveu a utilização de palma e etanol através da reação de transesterificação em meio ácido (patente 422.877) (CHAVANNE, 1938). Em 1938, o biodiesel foi utilizado pela primeira vez em uma linha de ônibus comercial entre Bruxelas e Louvain (KNOTHE, 2001).

No entanto, tanto por fatores técnicos quanto econômicos o óleo vegetal foi rapidamente substituído pelo óleo diesel (KNOTHE, 2001). Os aspectos ambientais, que hoje privilegiam os combustíveis renováveis produzidos a partir de matérias-primas vegetais, não foram considerados relevantes naquela época e o petróleo tornou-se fonte mundial de combustíveis (LIMA, 2005).

Portanto, o uso de óleos vegetais como combustível ficou restrito às situações de emergência, como durante as 1ª e 2ª Guerras Mundiais, onde houve corte nas linhas de abastecimento, causando a escassez de combustíveis fósseis (MA e HANNA, 1999). Tão logo o fornecimento do petróleo foi reativado, o interesse pelo desenvolvimento de combustíveis alternativos foi novamente deixado de lado (KNOTHE, 2001).

Assim, o petróleo foi adquirindo grande importância, a qual pôde ser vista com a crise do petróleo, entre 1973 e 1974, que elevou os preços em mais de 300% porque os países do Oriente Médio descobriram que o petróleo é um bem não-renovável e que, por isso, iria acabar algum dia.

Essa crise representou um verdadeiro marco na história energética do Planeta, pois o homem passou a valorizar as energias, posicionando-as em destaque, com relação aos bens de sua convivência. Assim, a utilização de combustíveis obtidos de vegetais foi novamente lembrada como alternativa interessante para o mundo (HILL, 2000) e, inclusive, para o Brasil, onde várias universidades brasileiras se dedicaram a estudar a produção de combustíveis substitutivos do diesel, que aproveitassem diversas matérias primas de origem vegetal (PARENTE, 2003; SCHUCHARDT *et al.*, 2001).

A partir deste cenário de crise energética, o governo promoveu o PROÁLCOOL (Programa Nacional do Álcool), o qual pretendia substituir parte do consumo da gasolina em álcool combustível (GOLDEMBERG *et al.*, 2004). Um planejamento para produção de óleos vegetais com fins carburantes (PRO-ÓLEO) também foi criado, elaborado pela Comissão Nacional de Energia, através da Resolução N<sup>o</sup> 007, de 22 de outubro de 1980.

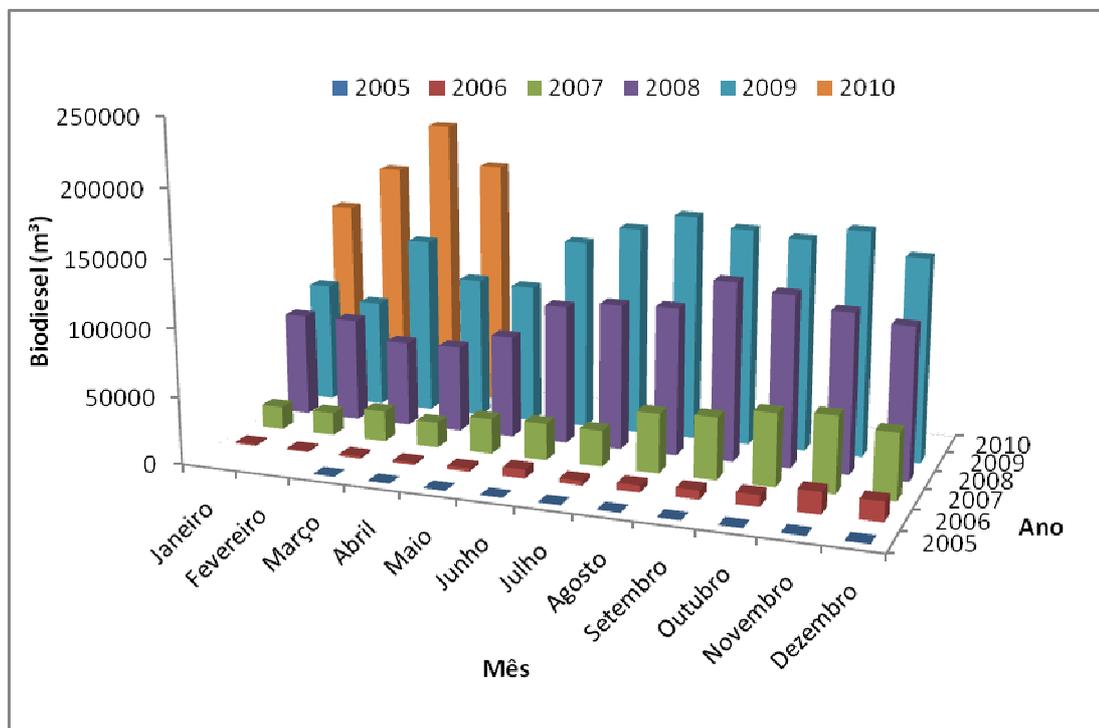
Naquela época, a transesterificação de óleos vegetais diversos, foi proposta como uma alternativa tecnológica (PARENTE, 2003). Infelizmente, após a queda dos preços do petróleo no mercado internacional, este programa foi abandonado em 1986. Em 1991, a Alemanha obteve o primeiro lote de 10 t de biodiesel, produzido a partir de óleo de colza. Durante o final da década de 90, países europeus definiram especificações para o biodiesel.

Somente no final do século XX, o Governo Federal no Brasil volta a discutir o uso de biodiesel. Em 2002, a etanolise de óleos vegetais foi considerada como a rota principal para um programa de substituição do diesel de petróleo batizado na Portaria MCT n<sup>o</sup> 702, de 30 de outubro de 2002 como PROBIODIESEL (SUAREZ *et al.*, 2007b). Em 2004 foi criado o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), sendo seu principal objetivo garantir a produção viável economicamente do biocombustível, tendo como meta a inclusão social e o desenvolvimento regional (SUAREZ *et al.*, 2007b).

A principal ação legal do PNPB foi a introdução de biocombustíveis derivados de óleos e gorduras na matriz energética brasileira através da Lei n<sup>o</sup>11.097, de 13 de janeiro de 2005, que previa o uso opcional de 2% de biodiesel adicionado ao diesel, também chamado de B2, até o início de 2008, quando passou a ser obrigatório. Em julho de 2008, entrou em vigor o aumento de 2% para 3% (B3). A adição de 4% de

biodiesel no diesel (B4) foi instituída em 1º de julho de 2009, conforme portaria ANP nº24 de 28 de julho de 2009. O B5 que inicialmente estava previsto em lei para começar a vigorar em 2013, foi antecipado para 1º de janeiro de 2010, de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicado no Diário Oficial da União de 26 de outubro de 2009.

Com o aumento da demanda de biodiesel no cenário brasileiro, o crescimento da produção de biodiesel é esperado. De acordo com a ANP, desde a introdução do biodiesel na matriz energética, em março de 2005, até abril de 2010, houve um crescente aumento na produção de biodiesel, como observado na figura 3.

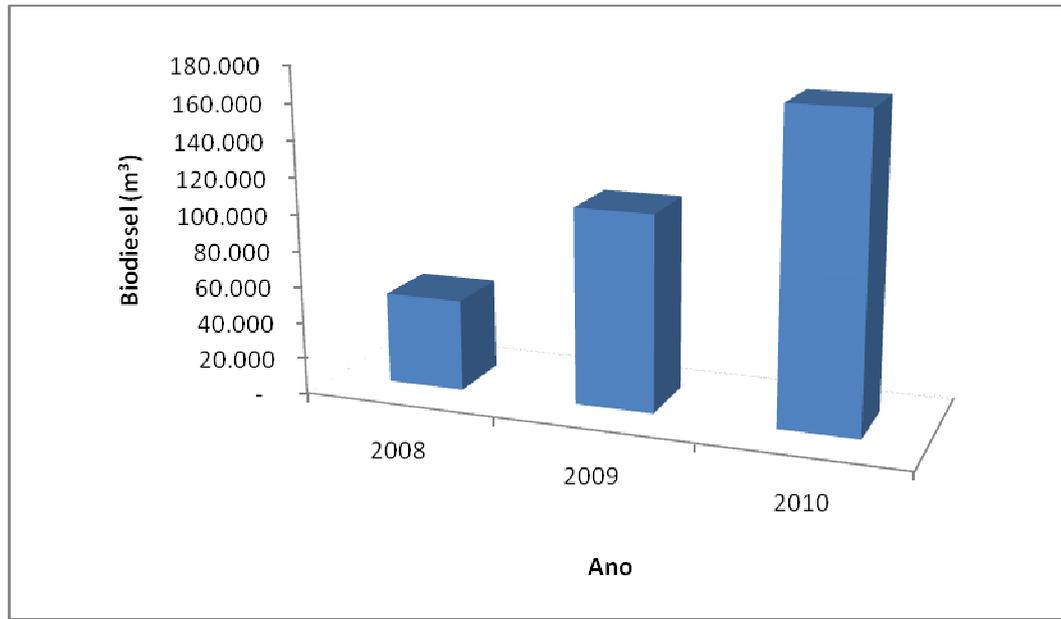


**Figura 3- Produção de biodiesel no Brasil de 03/2005 a 04/2010 (Fonte: ANP, 2010)**

Na figura 3 pode ser observado que a produção brasileira de biodiesel nos quatro primeiros meses de 2010 foi maior que a produção anual de 2005, 2006 e 2007 juntas. Em março de 2010, a produção brasileira bateu recorde de produção, com mais 213 milhões de litros produzidos.

Segundo o Ministério de Minas e Energia (MME), a atual capacidade instalada supera 345 milhões de litros/mês, dos quais 82% das empresas são detentoras do Selo Combustível Social (MME, 2010).

Dados da ANP colocam o Rio Grande do Sul (RS) no topo do ranking dos produtores de biodiesel no Brasil, e tem apresentado um crescimento notório, tendo a produção dos primeiros meses de 2010 triplicada quando comparada ao mesmo período em 2008, conforme ilustra a figura 4.



**Figura 4- Produção de biodiesel no Rio Grande do Sul comparando os quatro primeiros meses de 2008 a 2010 (Fonte: ANP, 2010)**

### 3.1.2 Propriedades dos ácidos graxos e processos para produção do biodiesel

Os maiores componentes de óleos vegetais e gordura animal são os triacilgliceróis, muitas vezes chamados de triglicerídeos. Quimicamente, os triacilgliceróis (TAG) são ésteres de ácidos graxos (AG) com glicerol (1,2,3-propanotriol) também chamado de glicerina (KNOTHE, 2006a). Os óleos provenientes de diferentes fontes possuem diferentes composições de ácidos graxos, podendo variar o comprimento da cadeia carbônica, o número de insaturações e ainda possuir outras funções químicas (SINGH & SINGH, 2010).

Os óleos vegetais *in natura* geralmente contém ácidos graxos livres, fosfolipídeos, esteróis, água e outras impurezas, que os impede de ser utilizado diretamente como combustível (NAIK *et al*, 2006). Além disso, outro fator importante

é a formação da acroleína (substância tóxica) através da decomposição térmica do glicerol (SCHUCHARDT *et al*, 1998).

Outros dois fatores são relevantes quanto à utilização direta de óleos vegetais: a alta viscosidade e a baixa volatilidade. 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), impedindo então a sua utilização direta em motores diesel, por conduzirem a sérios problemas operacionais nos motores, tais como a ocorrência de depósitos em várias partes do motor (KNOTHE, 2006; SCHUCHARDT *et al*, 1998; RAMADHAS *et al.*, 2004).

GHASSAN *et al.* (2003) demonstraram que a alta viscosidade e a baixa volatilidade dos óleos vegetais *in natura* podem provocar sérios problemas ao bom funcionamento de motores diesel, e que a utilização de ésteres etílicos, em alguns casos, superou o diesel em termos de desempenho de combustão e temperatura de escape.

Com o intuito de reduzir a alta viscosidade, que é considerada uma das principais propriedades combustível, diferentes métodos têm sido considerados, como: diluição direta com óleo diesel; formação de microemulsões dos óleos vegetais com álcoois de cadeia curta; craqueamento (pirólise) de óleo vegetais e a transesterificação. Dentre essas alternativas, a transesterificação destaca-se por ser relativamente simples e apresentar o produto com características físico-químicas bem próximas do diesel de petróleo (DUNN, 2002). A tabela 1 exemplifica algumas propriedades físico-químicas de alguns óleos vegetais, biodieseis e óleo diesel.

Como pode ser observado na tabela 1, a viscosidade do biodiesel é ligeiramente maior que a do óleo diesel, mas aproximadamente uma ordem de magnitude menor do que o óleo vegetal de origem, evidenciando a necessidade da transesterificação para obter um combustível com características bem semelhantes ao diesel fóssil.

**Tabela 1 – Características físico-químicas do óleo diesel, de alguns óleos vegetais e seus respectivos biodieseis**

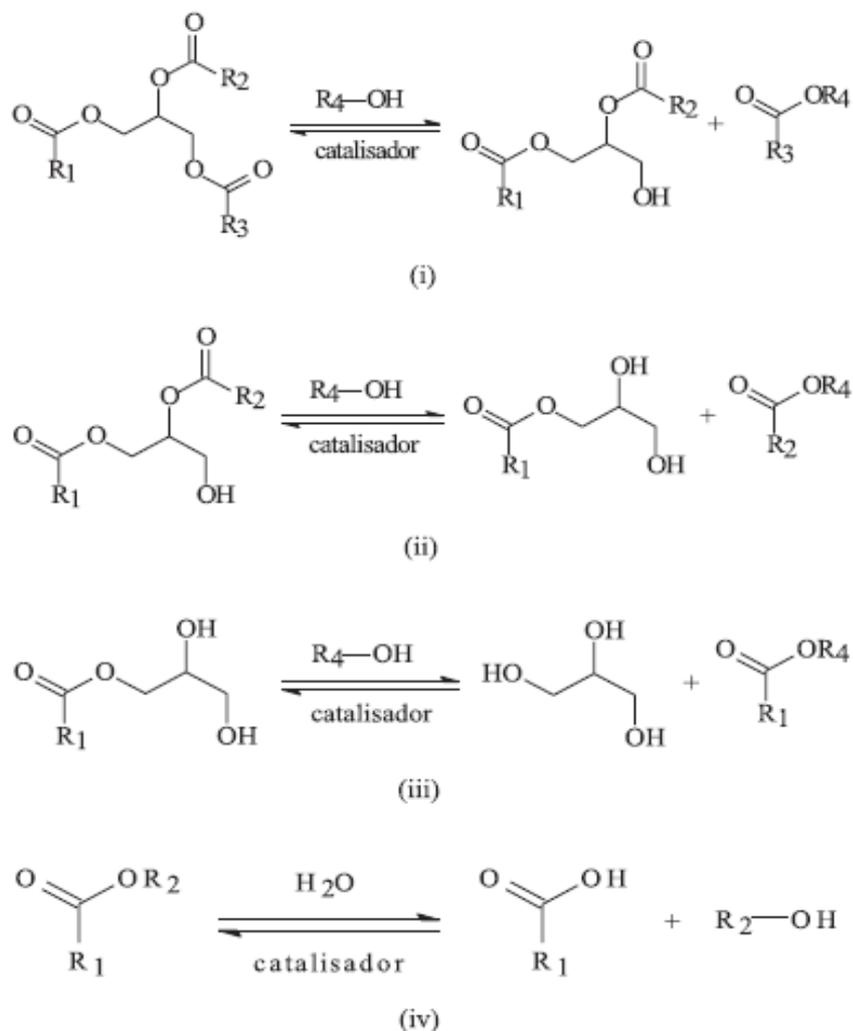
Características	Mamona		Babaçu		Dendê		Algodão		Soja		
	Óleo Diesel <sup>a</sup>	Óleo	Biodiesel	Óleo	Biodiesel	Óleo	Biodiesel	Óleo	Biodiesel	Óleo	Biodiesel
Poder Calorífico (Kcal/Kg)	10950	8913	9046	9049	9440	8946	9530	8050	9520	9241	9339
Ponto de Névoa (°C)	0	10	-6	26	-6	31	6	9	nd	13	nd
Índice de Cetano	40	Nd	Nd	38	65	38-40	Nd	40	57,5	36-39	57,8
Densidade a 25°C	0,8497	0,9578	0,919	0,9153	0,8865	0,9118	0,8597	0,919	0,875	nd	0,877
Viscosidade a 37,8°C (cSt)	2,0-4,3	285	21,6	30,3	3,9	36,8	6,4	40	6,0	36,8	5,89
Resíduo de Carbono (%)	0,35	Nd	0,09	0,28	0,03	0,54	0,02	0,42	nd	0,54	0,14

<sup>a</sup>Análise realizada pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TecPar, Curitiba-PR)

<sup>b</sup>BRANDÃO *et al*

nd = não determinado

Na transesterificação, os triglicerídeos reagem com um álcool de cadeia curta, na presença de catalisador, produzindo o biodiesel e ainda glicerol como sub-produto, conforme ilustra a figura 5. Várias revisões bibliográficas relacionadas à transesterificação como processo para a produção de biodiesel já foram publicadas na literatura (BONDIOLI, 2004; HOYDONCKX *et al*, 2004; FUKUDA *et al*, 2001; MA e HANNA, 1999; SCHUCHARDT *et al*, 1998), entretanto o processo mais utilizado ainda é a utilização de metanol e catalisadores alcalinos (NaOH ou KOH, ou ainda os alcóxidos correspondentes) (KNOTHE, 2006).



**Figura 5 – Reações envolvidas na transesterificação de triglicerídeos (FONTE: SUAREZ *et al.*, 2007)**

A reação de transesterificação é composta de três reações consecutivas e reversíveis, nas quais são formados diglicerídeos e monoglicerídeos como

intermediários (reações i a iii da figura 5). Apesar da estequiometria geral da equação requerer três mols de álcool para cada mol de triglicerídeo, a reversibilidade das reações i, ii e iii (Figura 5) exige um excesso de álcool para deslocar o equilíbrio para a formação dos produtos (SUAREZ *et al.*, 2007a).

Os produtos da transesterificação metílica são muitas vezes chamados de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, do inglês *fatty acid methyl esters*). Apesar de outros álcoois poderem por definição gerar biodiesel, muitas das especificações hoje existentes foram definidas de tal forma que apenas ésteres metílicos podem ser classificados como biodiesel, pelo menos nos casos em que todos os limites da especificação devam ser atendidos rigorosamente. O metanol apresenta um menor custo frente à outros álcoois (com excessão do Brasil, onde o etanol é mais barato)(KNOTHE, 2006a), além das vantagens físicas e químicas, tais como: maior polaridade, que facilita o processo de separação de ésteres e glicerina; apresenta a cadeia mais curta, que reage rapidamente com o triglicerídeo e a facilidade de dissolver catalisadores básicos (MA e HANNA, 1999).

Diferentes catalisadores podem ser utilizados: homogêneo ácido (CANACKI, 2007) ou básico (MA e HANNA, 1999) ou ainda heterogêneo químico (NARASSIMHARAO *et al.*, 2007) ou enzimático (FUKUDA, 2001). SCHUCHARDT *et al.* (1998) verificaram a aplicabilidade de diferentes tipos de catalisadores (ácidos, hidróxidos, alcóxidos e carbonatos de metais alcalinos, enzimas e bases não-iônicas, como aminas, amidinas, guanidinas e triamino(imino)fosforanos) enfatizando a utilização de guanidina heterogeneizada em polímeros orgânicos, propondo assim a substituição de catalisadores homogêneos por razões ambientais.

### 3.1.3 Principais matérias-primas

Dentre as fontes de biomassa consideradas adequadas e disponíveis para a consolidação de programas de energia renovável, os óleos vegetais têm sido priorizados por representarem alternativa para a geração descentralizada de energia, atuando como forte apoio à agricultura familiar, criando melhores condições de vida em regiões carentes, valorizando potencialidades de cada região e

oferecendo alternativas aos problemas econômicos e sócio-ambientais (RAMOS, 2003; KUCEK, 2004).

Mundialmente, as matérias-primas graxas mais utilizadas para a produção de biodiesel são os óleos vegetais refinados (KNOTHE *et al.*, 2006b). A escolha da matéria-prima depende, geralmente, das culturas favoráveis ao clima regional (SINGH & SINGH, 2010) e da abundância da mesma (KNOTHE *et al.*, 2006b). A viabilidade também dependerá de suas respectivas competitividades técnica, econômica e sócio-ambiental, passando inclusive por importantes aspectos agrônômicos, tais como:

- teor em óleos vegetais;
- produtividade por unidade de área;
- equilíbrio agrônômico e demais aspectos relacionados ao ciclo de vida da planta;
- ciclo da planta (sazonalidade)
- e adaptação territorial, que deve ser tão ampla quanto possível, atendendo às diferentes condições edafoclimática (KUCEK, 2004; RAMOS, 2003).

Nos Estados Unidos, as matérias-primas frequentemente utilizadas são a soja e as gorduras animais, já na União Européia os óleos de colza e girassol são os mais utilizados. Nos países tropicais o óleo de palma é o predominante na produção de biodiesel (KNOTHE *et al.*, 2006b; VAN GERPEN, 2001).

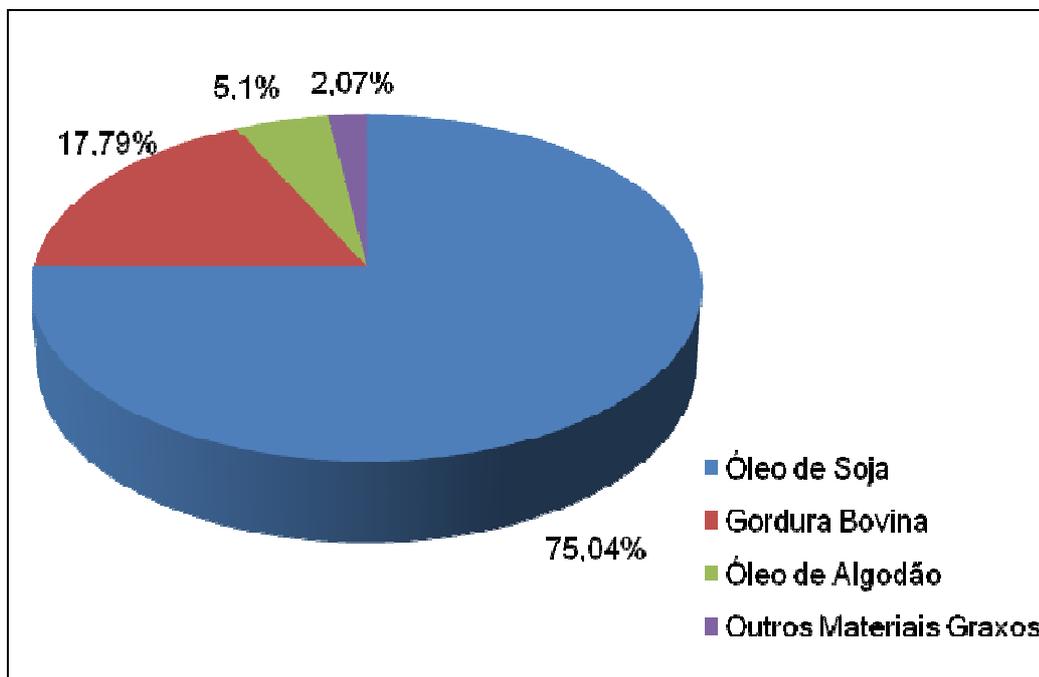
No entanto, os Governos Federais de cada país podem afetar a opção da matéria-prima, estabelecendo subsídios em programas nacionais favorecendo uma matéria-prima em relação à outra. Um exemplo que pode ser citado é o caso dos Estados Unidos, onde incentivos fiscais favorecem o uso de óleo de soja refinado como matéria-prima.

No caso do Brasil, embora seja o segundo produtor mundial de soja, o governo brasileiro tem se empenhado em promover a produção de biodiesel de outras fontes, principalmente porque o mercado de soja já está bem estabelecido, e ainda o mercado de biodiesel poderá facilitar a geração de renda nas regiões mais pobres do país, onde a soja não pode se cultivada (KNOTHE *et al.*, 2006b).

Com isso, o governo através do PNPB, passou a priorizar as culturas de dendê, soja, mamona, caroço de algodão, nabo forrageiro e girassol, concedendo incentivos fiscais de acordo com o zoneamento agrícola e a aptidão regional

(BRASIL, 2005a). Por exemplo, para o biodiesel fabricado a partir de mamona ou palma produzida nas regiões Norte, Nordeste ou Semi-Árido pela agricultura familiar, a desoneração é total, ou seja, a alíquota efetiva é nula (BRASIL, 2005b).

Entretanto, segundo a ANP, a produção de biodiesel no Brasil ainda tem como principal matéria-prima a soja. Conforme publicado em boletim, relativo a novembro de 2009, a utilização de óleo de soja chegou a 75% do total de matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel, conforme apresentado na figura 6 (ANP, 2010).



**Figura 6- Percentual de matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel – Brasil – 2009 (Fonte: ANP, 2010)**

Embora o governo brasileiro tenha priorizado apenas algumas culturas de oleaginosas, diversas pesquisas realizadas em Universidades no Brasil utilizando óleos vegetais “alternativos” foram publicados, no que diz respeito às matérias-primas que não possuem incentivos fiscais, e que apresentaram bons rendimentos e qualidade, como o óleo de canola (CAVALCANTI *et al.*, 2009), babaçu (MOURA *et al.*, 2007), pinhão manso (SUAREZ *et al.*, 2009a), micro algas (CARIOCA *et al.*, 2009), tucumã (MOURA *et al.*, 2008); alguns óleos de origem animal, como óleos de peixe (FERNANDES *et al.*, 2010), sebo bovino (SUAREZ, *et al.*, 2009b), e ainda os óleos residuais de fritura (RAMOS *et al.*, 2000).

Com o intuito de diversificar a utilização de oleaginosas não comestíveis no ramo de biocombustíveis e vincular a produção com agricultura sustentável, uma alternativa que vem sendo estudada no Rio Grande do Sul é a utilização do óleo de tungue como matéria-prima para a produção de biodiesel. A Universidade Federal do Rio Grande (FURG) em parceria com a Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e Embrapa de Pelotas aprovaram um projeto para o estudo do desenvolvimento da cultura do tungue na região de clima temperado. KAUTZ (2010) realizou o estudo sobre a produção do biodiesel etílico de tungue, otimizando técnicas de extração de óleo e das reações de esterificação e transesterificação.

Outros trabalhos referentes à produção e controle de qualidade do biodiesel também foram desenvolvidos na FURG. Produção de biodiesel utilizando diferentes processos e matérias-primas, tais como: girassol (MOURA, 2010), blendas sebo/soja (MAGALHÃES, 2010), mamona (HAERTEL, 2009), e micro algas (VIEGAS, 2010); e a determinação simultânea de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel etílico de mamona, girassol e mistura sebo:soja (DIAS, 2010).

#### 3.1.4 Tungue

O tungue (*Aleurites fordii* ou *Aleurites montana*) é um cultivo originário da Ásia, produzido em grande quantidade na China. Atualmente é cultivada na América do Sul (Argentina e Paraguai principalmente), África e Estados Unidos (GRUSZYNSKI *et al.*, 2003).

No Brasil, sua cultura foi introduzida no início do século XX, e no Rio Grande do Sul (RS) pode ser encontrada principalmente na serra gaúcha, nos municípios de Veranópolis e Fagundes Varela (GRUSZYNSKI *et al.*, 2003). A planta do tungue apresenta resistência a pragas e moléstias e seu fruto é de fácil armazenagem. A planta, as sementes e o fruto podem ser visualizados na figura 7.

A cultura do tungue é adaptada ao clima temperado e pouco exigente em relação ao solo, contudo necessita de frio (aproximadamente 7°C) para retomar seu crescimento após o inverno (DUKE, 1983). A produtividade da cultura é de aproximadamente 10 ton.ha<sup>-1</sup>, podendo chegar a 12 ton.ha<sup>-1</sup>.do fruto (CASAGRANDE, 2008). A colheita dos frutos é manual, à medida que os frutos, que

contém de quatro a cinco sementes, caem ao chão, não havendo mecanização da colheita, o que favorece a agricultura familiar. (DUKE, 1983).



**Figura 7- Árvore do tungue, frutos e sementes**

A extração do óleo da semente do tungue pode ser feita por prensagem e com o uso de solventes. O óleo é utilizado principalmente na indústria de tintas e vernizes por sua alta qualidade como óleo secante. A semente do tungue apresenta elevado teor de óleo, possuindo aproximadamente 43% (DUKE, 1983). A composição dos ácidos graxos do óleo de tungue estão descritos nas tabela 2 e 3, de acordo com *Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes* (AOCS) e PARK *et al.* (2008) respectivamente.

**Tabela 2 – Ácidos graxos presentes no óleo de tungue Fonte: AOCS**

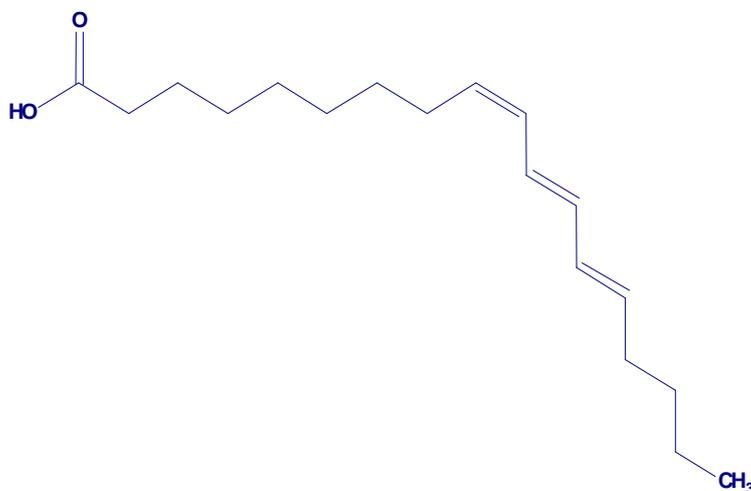
<b>Ácidos Graxos</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Valores de Referência (%)</b>
Ácido Palmítico	C16:0	2,0
Ácido Esteárico	C18:0	3,0
Ácido Oléico	C18:1	4,0 - 10,0
Ácido Linoléico	C18:2	8,0 - 15,0
Ácido Linolênico	C18:3	2,0
<b>Ácido <math>\alpha</math>-eleosteárico</b>	<b>C18:3c</b>	<b>71,0 - 82,0</b>

PARK *et al.* (2008) apresentam uma composição semelhante com a tabela 2, porém identificam traços de outros três ácidos graxos diferentes, o ácido behênico, o ácido heneicosanóico e o ácido eicosanóico, e não identificaram o ácido linolênico no perfil graxo da amostra, demonstrada na tabela 3.

**Tabela 3 – Composição dos ácidos graxos do óleo de tungue Fonte: PARK (2008)**

Ácidos Graxos	Estrutura	Valores de Referência (%)
Ácido Palmítico	C16:0	3,3
Ácido Esteárico	C18:0	2,2
Ácido Oléico	C18:1	8,56
Ácido Linoléico	C18:2	11,51
<b>Ácido <math>\alpha</math>-eleosteárico</b>	<b>C18:3c</b>	<b>63,80</b>
Ácido Eicosanóico	C20:1	0,75
Ácido Heneicosanóico	C21:0	0,46
Ácido Behênico	C22:0	8,39

Também pode ser observado nos valores das tabelas 2 e 3, que o ácido  $\alpha$ -eleosteárico (cis, trans, trans-9,11,13-octadecatrienoic acid) é o composto predominante no óleo de tungue, sendo o único óleo vegetal produzido comercialmente que possui esse componente, ao qual é atribuída a alta qualidade do tungue como óleo de secagem rápida (DUKE, 1983). A estrutura do ácido  $\alpha$ -eleosteárico está representada na figura 8.



**Figura 8 – Estrutura do ácido  $\alpha$ -eleosteárico**

Em 1940, o primeiro trabalho relacionado ao óleo de tungue foi publicado. O processo de craqueamento (ou pirólise) de óleos vegetais foi amplamente utilizado na China, principalmente com o óleo de tungue, para posterior utilização em motores diesel. Após a diminuição dos preços dos barris de petróleo, as pesquisas na área foram perdendo espaço (KNOTHE, 2006a).

Muitos anos depois, PARK e colaboradores (2008) descreveram em seus estudos a utilização do óleo de tungue para a produção de biodiesel. O objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade da produção do biodiesel de tungue, otimizando as proporções de metanol:óleo e catalisador expressando resultados através das taxas de conversão dos ácidos graxos, e ainda realizando análises de: estabilidade à oxidação; índice de acidez; temperatura de congelamento; perfil graxo e glicerina total. Os melhores resultados foram 7,5:1 (metanol : óleo) e 20,8% de catalisador (Amberlyst-15) em relação à quantidade de óleo, a 80 °C por 2 horas. Os valores obtidos para temperatura de congelamento foram considerados ótimos, embora os valores de viscosidade, estabilidade à oxidação e porcentagem de FAME's foram insatisfatórios de acordo com a EN 14214.

Até o momento, dois trabalhos foram publicados em revistas científicas para biodiesel de tungue através da transesterificação, o primeiro está citado acima e o segundo trata-se de um complemento do primeiro artigo, proposta por SHANG *et al.*(2010), que descrevem o efeito da proporção metanol:óleo, da temperatura, e do tempo de reação. Pesquisas realizadas nas bases de dados Science Direct, Scopus e Web Science utilizando “tung oil and biodiesel”, “tung biodiesel”, “chinese oil”, “ $\alpha$ -eleostearic acid” e “tung oil” como palavras-chaves, não encontrou trabalhos relacionados à análise do perfil graxo do biodiesel de tungue, o que torna ainda mais relevante este estudo.

### 3.1.5 Influência da composição dos ácidos graxos sobre algumas propriedades do biodiesel

Visto que a transesterificação de um óleo ou gordura leva a um biodiesel com o perfil graxo correspondente ao do óleo ou gordura de origem, o biodiesel é uma

mistura de ésteres de ácidos graxos, onde cada éster contribui para as propriedades do combustível. As propriedades do biodiesel que podem ser determinadas pelo perfil graxo são: qualidade de ignição, calor de combustão, ponto de entupimento do filtro à frio, estabilidade oxidativa, viscosidade e lubricidade. Knothe e colaboradores (2005) discutiram a influência da estrutura dos ésteres de ácidos graxos sobre essas propriedades.

A qualidade de ignição geralmente é analisada através da análise do número de cetano (NC), que determina o desempenho do biodiesel em questão quando comparado com o desempenho do hexadecano, o qual é atribuído um número de cetano igual a 100. Através da análise do perfil graxo do biodiesel é possível investigar se o biodiesel terá alto NC ou não, ou seja, quanto mais cadeias insaturadas tiverem os ésteres, menor será o NC e vice-versa. Em resumo, para obter elevados números de cetano, cadeias lineares seriam as ideais (KNOTHE *et al.*, 2005).

O calor de combustão também está relacionado com o comprimento da cadeia carbônica, ou seja, são diretamente proporcionais. Ramificações e insaturações em compostos com o mesmo número de carbonos também influenciam o calor de combustão, mas neste caso são inversamente proporcionais, com o aumento de saturação ou ramificação, ocorre um decréscimo do calor de combustão. Além destes fatores, o grupamento cedido pelo álcool na reação (metila ou etila, na maioria dos casos), pelo fato de possuir maior ou menor cadeia de carbonos, tem a característica de aumentar ou diminuir o calor de combustão em, geralmente,  $\pm 150 \text{ kcal mol}^{-1}$  (KNOTHE, 2005).

Um dos maiores problemas associados ao uso do biodiesel é o ponto de entupimento do filtro a frio (CEFF), do inglês *cold flow plugging point* (CFPP), que é a temperatura na qual o biodiesel torna-se turvo devido à formação de cristais de solidificação. Cadeias saturadas têm uma tendência maior a se solidificarem a baixa temperatura, tornando-se um inconveniente em climas frios. A presença de cadeias insaturadas ameniza a possibilidade de solidificação do biodiesel (DABDOUB, 2009).

Os problemas relacionados com a estabilidade à oxidação dão-se principalmente durante o armazenamento prolongado do biodiesel, sendo influenciado por diversos parâmetros como a presença de luz, calor, ar, traços de metal, peróxidos, entre outros, bem como a natureza do local de armazenagem

(KNOTHE, 2007). Mas não somente fatores externos estão ligados a estabilidade do biodiesel, mas também a composição dos ésteres do mesmo. Um dos principais motivos da auto-oxidação é a presença de duplas ligações nas cadeias dos ésteres graxos (ARACIL *et al.*, 2007).

As insaturações presentes nas cadeias dos ésteres graxos ainda influenciam outras propriedades, como a viscosidade e a lubricidade. A viscosidade diminui consideravelmente com o aumento grau de insaturação. Allen *et al.* (1999) desceveram a possibilidade de prever a viscosidade de determinado óleo vegetal a partir da composição em ácidos graxos através de equações logarítmicas. Ainda que o biodiesel já possua boas propriedades lubrificantes, a presença de ésteres insaturados acrescenta ainda mais lubricidade ao biodiesel que ésteres saturados. Alguns estudos demonstram a melhora da lubricidade do diesel fóssil mesmo com a adição de poucas quantidades de biodiesel (DROWN *et al.*, 2001; HU *et al.*, 2005) principalmente em diesel com baixos teores de enxofre (ANASTOPOULOS *et al.*, 2005).

Percebe-se, portanto, que a simples análise do perfil graxo do biodiesel é suficiente para se inferir sobre possibilidades, avaliar o processo de produção e adequação do uso de uma determinada matéria-prima quanto à produção de um biodiesel de boa qualidade.

### **3.2 Método de referência para análise de FAME's**

No Brasil, o órgão regulador para o controle de qualidade do biodiesel, assim como outros combustíveis é a ANP. As especificações contidas na Resolução nº 4 de 2 de fevereiro de 2010 (ANP 04/2010) foram constituídas com base nas normas EN 14103 e ANBT 15342 (4) e (5) para análise do teor de ésteres presentes em biodiesel.

O método proposto pela norma europeia EN 14103 utiliza a cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID) para a realização das análises. O padrão interno descrito no método é o metil heptadecanoato (C17:0). Os parâmetros cromatográficos são os seguintes: coluna capilar com polietileno glicol (PEG) como fase estacionária (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm), temperatura do injetor

de 250 °C, temperatura do detector de 250°C e hidrogênio ou hélio como gás de arraste (o fluxo do gás pode ser variado de 1 a 2 mL min<sup>-1</sup>).

Para o cálculo do teor de ésteres, faz-se a integração a partir do miristato de metila (C14:0) até o nervonato de metila (C24:1), compreendendo todos os picos nesta faixa, inclusive os menores. Após utiliza-se a seguinte equação (1):

$$C = \frac{(\sum A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{W} \times 100 \quad (1)$$

onde:

$\sum A$  = somatório da área dos picos compreendidos entre o C14:0 e C24:1

$A_{EI}$  = área correspondente ao metil heptadecanoato (padrão interno)

$C_{EI}$  = concentração, em mg mL<sup>-1</sup>, da solução do metil heptadecanoato

$V_{EI}$  = volume, em mL, da solução do metil heptadecanoato

$W$  = massa, em mg, da amostra.

É importante salientar que o método proposto é indicado para a análise de ésteres compreendidos entre o C14:0 e o C24:0. Biodieseis com perfil graxo diferentes, como o de sebo, por exemplo, que contêm ésteres como o C12:0 (éster láurico) não podem ser analisados sem que haja modificação do método. Ademais, o padrão interno recomendado pela EN14103 também é encontrado no biodiesel de sebo, o que torna o método impróprio para algumas matrizes de biodiesel.

### 3.2.1 Outros métodos para análise de FAME's

Outros métodos para análise de FAME's em biodiesel foram desenvolvidos. Fu e colaboradores (2008) desenvolveram um método de análise de FAME's utilizando HPLC-RID (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Índice de Refração, do inglês *High Performance Liquid Chromatographic with Refractive Index Detector*) com coluna C18W (250 mm x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de partícula e metanol (1 mL min<sup>-1</sup>) como fase móvel. Resultados demonstraram boa

separação dos ésteres, exceto para os ésteres oléico e palmítico, que coeluíram, entretanto o método apresentou longo tempo de análise (aproximadamente 1 hora).

Yizhe *et al.* (2008) descreveram um método para determinação de 11 ésteres de ácidos graxos presentes em biodiesel utilizando UPLC-ELSD (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com Detecção por Dispersão de Luz por Evaporação, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detector*) com coluna UPLC BEH phenyl C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm de diâmetro da partícula) e acetonitrila/água (3:1, v/v) como fase móvel (0,3 mL min<sup>-1</sup>). Resultados mostraram boa linearidade do método na faixa de 0,01- 10,0 µg mL<sup>-1</sup> com coeficiente de correlação maiores que 0,997. De acordo com os autores, o método se mostrou mais rápido, simples e apresentou boa separação dos ésteres.

Um trabalho sobre a determinação de ésteres e glicerídeos simultaneamente foi proposto por Di Nicola e colaboradores (2008) utilizando HPLC-UV (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção no Ultravioleta, do inglês *High Performance Liquid Chromatography with a Ultraviolet detector*). A coluna utilizada foi Mediterrânea sea 18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm de diâmetro da partícula) e modo gradiente de eluição foi utilizado. O estudo realizado foi para otimizar diversos parâmetros cromatográficos, como separação, gradientes de eluição, porcentagem de fase móvel, diferentes proporções entre solventes da fase móvel entre outros. Os resultados demonstraram boa separação entre os glicerídeos e os ésteres graxos, entretanto os ésteres graxos coeluem, apresentando apenas dois picos para quatro ésteres e o padrão interno no cromatograma com as condições otimizadas.

Alguns trabalhos também foram realizados utilizando a cromatografia gasosa. SVEIN (2004) publicou um trabalho completo sobre a predição da estrutura dos ésteres de ácidos graxos através da espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons, na faixa de 50-110 u.m.a.. A proposta da identificação dos ésteres acontece através dos picos base obtidos no espectro do composto, distinguindo assim, cadeias saturadas, mono-, di e poli-insaturadas, umas das outras. A ordem de eluição também foi considerada nos resultados do trabalho, uma vez que os ésteres eluem conforme o decréscimo de saturação.

Já MITTELBACH *et al.* (2006) propuseram em seus estudos algumas modificações no método EN14103. Entre as principais modificações incluem-se a

troca do padrão interno e a mudança da programação da temperatura do forno cromatográfico. Os resultados do estudo mostraram que a norma válida para a determinação de ésteres pode levar a falsos resultados. Além disso, a simples modificação da programação na temperatura permitiu a inclusão de ésteres graxos de cadeia curta no cálculo do teor de ésteres.

A determinação da matéria-prima utilizada na produção de biodiesel adicionado ao diesel foi proposta por ROCHA e colaboradores (2008). As análises foram realizadas utilizando-se GC-MS através do monitoramento seletivo de íons (SIM, do inglês *Selective Ion Monitoring*) com o sistema de “janelas de eluição”. De acordo com os autores, o método desenvolvido apresenta alta sensibilidade e seletividade para a identificação dos ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos quando adicionados ao diesel mineral. Para tal, foram preparadas misturas de 2% de biodiesel (de quatro diferentes óleos vegetais e obtidos por rota metílica e etílica) ao diesel para a realização das análises. A diferenciação dos biodieseis foi realizada através de seus compostos majoritários e dos fragmentos característicos gerados pelos mesmos. O método se mostrou aplicável para amostras comerciais de diferentes postos de gasolina, indicando que o biodiesel presente no diesel era proveniente do óleo de soja e obtido através da rota metílica.

### 3.3 Cromatografia

A cromatografia é um poderoso método de separação que encontra aplicação em todos os ramos da ciência, e pode ser conceituada como um método físico-químico de separação no qual os constituintes da amostra são particionados entre duas fases, uma estacionária, geralmente de grande área, e a outra, móvel, um fluído insolúvel na fase estacionária, que percola através da primeira (CIOLA, 1998; SKOOG *et al.*, 2002). 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).

A técnica foi inventada e denominada pelo botânico russo Mikhail S. Tswett no início do século 20, em 1903. Ele empregou a técnica para separar vários pigmentos de plantas como clorofila e xantofila, passando soluções desses componentes através de uma coluna de vidro empacotada com carbonato de cálcio finamente dividido. A passagem do solvente era feita por gravidade. (CIOLA, 1998; SKOOG *et al.*, 2002). As espécies separadas apareciam como bandas coloridas na coluna, o que colaborou para a escolha do nome da técnica (em grego *chroma* significa cor e *graphein* significa escrever) embora ele tenha explicitado que o processo não depende da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados (COLLINS *et al.*, 2006).

Desde então, esta técnica desenvolveu-se e ampliou-se até uma forma instrumental com elevada sofisticação, inicialmente com a cromatografia gasosa (GC), posteriormente, a cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) e, finalmente, a cromatografia com fluido supercrítico (SFC, do inglês *Supercritical Fluid Chromatography*), concebida nos anos 60, mas empregada muito tempo depois de seu desenvolvimento (MÜHLEN e LANÇAS, 2004).

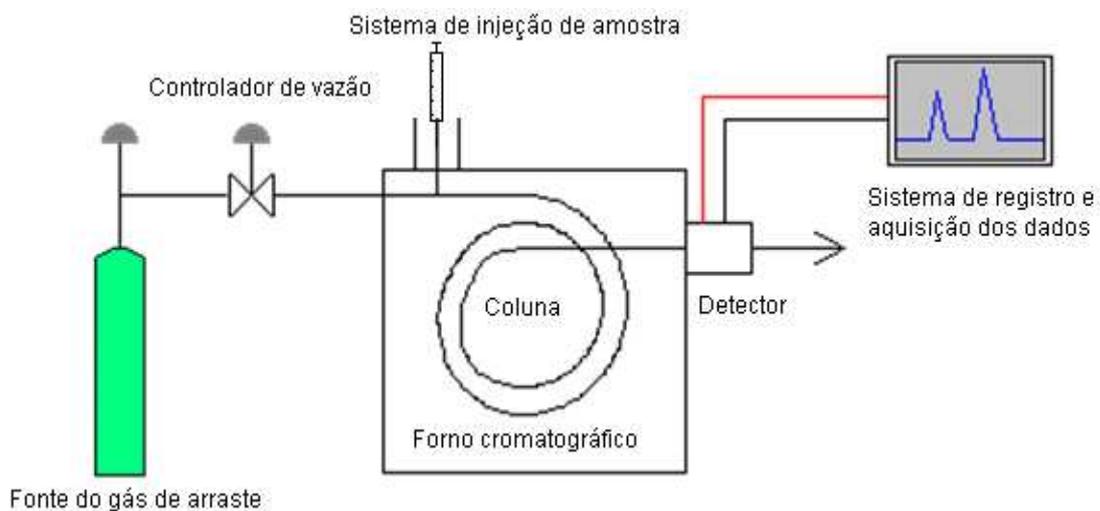
### 3.3.1 Cromatografia Gasosa

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). Se a fase estacionária for um sólido, ocorre a adsorção dos compostos. No caso de um líquido ocorre a partição. Em GC o retorno dos compostos a fase móvel está relacionado com a sua volatilidade.

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 menor 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).

Um sistema básico de um cromatógrafo a gás é mostrado na figura 9, evidenciando os principais componentes, como: fonte do gás de arraste, controlador de vazão, sistema de injeção de amostra, coluna, forno cromatográfico, detector e sistema de aquisição e registro dos dados.



**Figura 9- Componentes básicos de um cromatógrafo a gás**

A fase móvel, sendo gasosa, torna possível um equilíbrio rápido entre ela e a fase estacionária, fazendo da cromatografia gasosa um sistema altamente eficiente. O gás de arraste não deve interagir com o recheio da coluna, deve ter alta pureza, e ser compatível com o detector usado.

A injeção da amostra deve ser feita de tal maneira que se obtenha uma banda única e estreita. A quantidade de amostra injetada não deve ultrapassar a capacidade da coluna, que é determinada pela quantidade de fase estacionária. As amostras, que podem ser líquidas ou gases, são injetadas utilizando microsseringas e seringas ou válvulas, respectivamente (COLLINS *et al.*, 2006). A injeção através de um septo, que pode ser de silicone ou politetrafluoretileno (PTFE), com o emprego de microsseringas são as mais utilizadas e apresentam repetitividade de  $\pm 1\%$  (COLLINS *et al.*, 2006).

Diferentes modos de injeção podem ser utilizados. Em colunas capilares, podem ser encontrados injetores tipo com divisor/sem divisor da amostra (S/SL do inglês, *split/splitless*), onde a divisão da amostra é realizada de acordo com a taxa *split* escolhida; e injetores on column, onde a amostra é injetada diretamente na coluna, com modos de injeção à frio (*cold-on column*) e vaporização com programação de temperatura (OCI/PTV, do inglês On Column Injector/ *Programmed Temperature Volatilisation*);

Os detectores mais utilizados em cromatografia gasosa são: detector por ionização em chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*), detector por condutividade térmica (TCD, do inglês *Thermal Conductivity Detection*), detector por captura de elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detector*), detector termoiônico (TID, do inglês *Thermionic Ionization Detector*), detector fotométrico de chama (FPD, do inglês *Flame Photometric Detector*) e o espectrômetro de massas (MS, do inglês *Mass Spectroscopy*).

### 3.3.2 Espectrometria de Massas

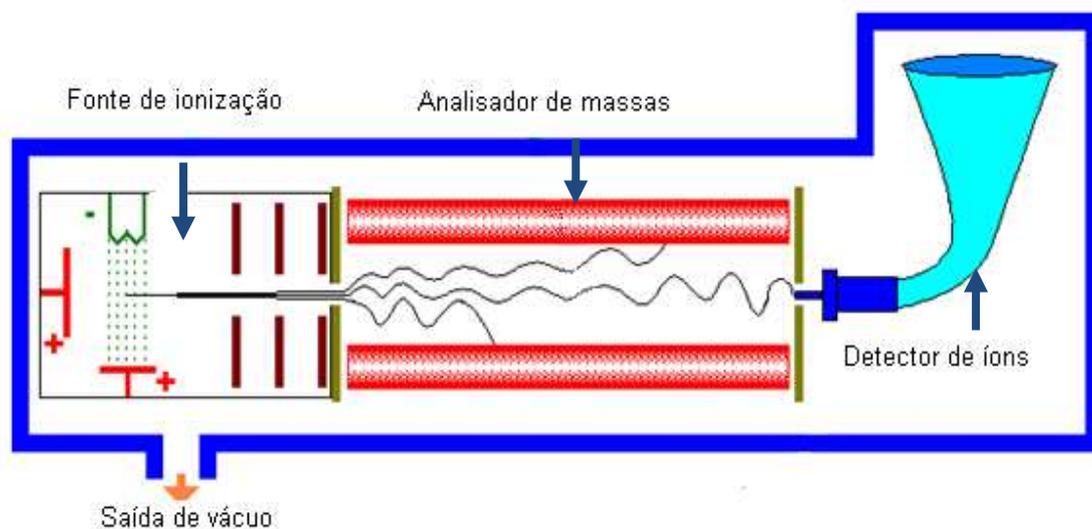
É possível atingir um elevado grau de certeza na identificação molecular pelo acoplamento de sistemas cromatográficos ou afins, a diversos espectrômetros. Embora a informação quantitativa obtida de um cromatograma seja usualmente boa, a certeza da identificação baseada apenas nos parâmetros de retenção pode ser insuficiente. As técnicas espectroscópicas proporcionam uma informação qualitativa excelente e permitem a identificação de uma substância pura. Assim, a combinação de técnicas cromatográficas e espectroscópicas oferece maior número de informações sobre a amostra do que é possível se obter com cada uma isoladamente (NETO; NUNES, 2003 apud CALDAS, 2009).

A espectrometria de massas é uma ferramenta que tem sido utilizada há muito tempo para a análise de isótopos e para determinar a estrutura de moléculas orgânicas. É, atualmente, uma técnica poderosa de detecção para a cromatografia, pois o espectrômetro é sensível a pequenas quantidades do analito, fornece informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos que são eluídos a partir de uma coluna, e pode distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção (HARRIS, 2003).

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).

O sistema básico de um espectrômetro de massas, representado na Figura 10, é composto por: sistema de injeção da amostra, fonte de íons, analisador/separador de massas, detector e sistema de aquisição de dados.

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).



**Figura 10- Componentes básicos de um espectrômetro de massas**

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, produzindo 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* ( $1\text{eV}=96,5\text{kJ/mol}$ ), que é 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).

Os modos de operação são as maneiras como o espectrômetro de massas pode ser programado para a aquisição de dados. No modo *scan* o MS é programado de forma a analisar todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada de  $m/z$  (VÉKEY, 2001). No modo SIM (do inglês, *Single Ion Monitoring*) após a ionização o MS faz a separação de somente um íon específico, o que aumenta a sensibilidade, uma vez que os íons correspondentes ao ruído são ejetados sem chegar ao detector. Em alguns equipamentos podem ser selecionados até três íons simultaneamente (VÉKEY, 2001).

### 3.4 Validação de métodos cromatográficos

A validação de um método é uma exigência na prática de análises químicas, e tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (EURACHEM, 1998; BRASIL, 2003).

Um laboratório deve produzir resultados analíticos confiáveis. O analista, no seu dia a dia, deve preocupar-se em obter resultados que afastem qualquer dúvida

com respeito a sua exatidão e que possuam precisão adequada para a finalidade a que se destinam (SOARES, 2001apud CALDAS, 2009). Para que esta confiabilidade seja atingida, o primeiro passo está na validação do método analítico escolhido. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2003).

Ribani e colaboradores (2004) apresentaram, de maneira clara e objetiva, a validação de métodos como sendo um processo contínuo de avaliação dos métodos, desde a etapa de planejamento, passando pelo desenvolvimento e coleta de dados, até o monitoramento constante da aplicação e transferência deste.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003.

Órgãos como *International Conference on Harmonisation (ICH)*, *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, *International Standard Organisation (ISO)* e outros exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (RIBANI *et al.*, 2004). A maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação

O que se pode observar é que não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação (RIBANI *et al.*, 2004). Para cada caso há necessidade de resultados experimentais evidentes, que garantam a funcionalidade do método, bem como do tratamento analítico adequado, da avaliação estatística dos resultados e da definição dos critérios de aceitação (VALENTINI *et al.*, 2007).

Assim, deve-se selecionar, estudar e monitorar constantemente os parâmetros mínimos necessários para garantir a interpretação inequívoca dos resultados. Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos

analíticos são: curva analítica, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação e seletividade.

### 3.4.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade refere-se à capacidade de uma metodologia analítica de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em uma faixa analítica especificada (BRASIL *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003). O coeficiente de correlação  $r$  permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI *et al.*, 2004). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

A linearidade é determinada por intermédio de gráficos de calibração, denominados curvas analíticas, seguidos de um tratamento estatístico (LANÇAS, 2004). A curva analítica deve ser definida por no mínimo cinco pontos em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa do RSD entre as injeções inferiores a 5% (RIBANI *et al.*, 2004, BRASIL, 2003).

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 (Equação 1) (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2003). 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

#### 3.4.1.1 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. Com a utilização de um padrão interno adequado, melhoras na precisão e exatidão são facilmente obtidas (SKOOG, 2006).

#### 3.4.2 Seletividade

Seletividade do método é uma das medidas que garantem a credibilidade das medidas na presença de interferentes (EURACHEM, 1998), e é geralmente estudada investigando a sua habilidade em determinar o analito em testes onde os interferentes normalmente presentes nas amostras estão presentes. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender

da concentração. Onde não está claro o que é ou não interferência, a seletividade do método pode ser investigada pelo estudo de sua habilidade em medir o analito comparando com outras técnicas/métodos independentes (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003).

A cromatografia é um poderoso método de separação de compostos mas não de identificação. A cromatografia apenas fornece dados auxiliares na identificação de compostos (SOARES, 2001 apud CALDAS 2009), por isso, em métodos cromatográficos, é preciso tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos (BRASIL, 2003). A confirmação do resultado não é obrigatória, e deve ser decidida pelo laboratório e em cada caso.

É necessário estabelecer que o sinal produzido durante a análise, o qual foi atribuído ao analito, é realmente devido ao analito e não devido à presença de alguma substância química ou fisicamente similar. Isso é a confirmação da identidade (EURACHEM, 1998).

Para comprovar que um composto com certo tempo de retenção é o que se julgava ser pode ser comparado o tempo de retenção do composto com o dos padrões, ou utilizar a co-cromatografia, que consiste em adicionar uma quantidade de padrão na amostra e depois verificar se há aumento do pico ou há surgimento de outro pico (SOARES, 2001 apud CALDAS, 2009).

Outra maneira de realizar a confirmação é através de uma técnica ou conjunto de técnicas. O uso de sistemas com detectores altamente específicos, como os espectrômetros de massas, é recomendado. Detectores seletivos acoplados com técnicas de GC e LC, como detecção por captura de elétrons (ECD, do inglês *electron capture detection*), fotométrico de chama (FPD, do inglês *flame photometric detection*), de nitrogênio e fósforo (NPD, do inglês *nitrogen-phosphorus detection*), DAD (DAD, do inglês *diode array detector*) e fluorescência, também oferecem especificidade (SANCO, 2007). A utilização de testes de pureza de pico, com auxílio de detectores DAD e MS são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (BRASIL, 2003).

Alguns procedimentos analíticos são específicos o suficiente para dispensar maiores esforços de confirmação, isto é, o processo de extração do analito da matriz, a remoção de interferentes e a etapa cromatográfica são suficientemente específicas para dar ao analista a segurança necessária para afirmar qual a

identidade do composto. Tais situações, no entanto, são a exceção e não a regra em química analítica (SOARES, 2001 apud CALDAS, 2009).

### 3.4.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O Limite de Detecção (LD, do inglês *Limit of Detection*) e o Limite de Quantificação (LQ, do inglês *Limit of Quantification*) referem-se à menor concentração do analito presente em uma amostra que possa ser detectado e quantificado, respectivamente, sob as condições experimentais estabelecidas, em um nível aceitável de precisão e exatidão. São expressos em percentual ou em unidades de concentração (EURACHEM, 1998; BRASIL, 2003; VALENTINI *et al.*, 2007).

O LD e o LQ podem ser estimados por diferentes meios: pelo método da relação sinal/ruído, do desvio padrão e por processos estatísticos. O método mais utilizado para técnicas analíticas em geral é o da relação sinal-ruído (RIBANI *et al.*, 2004).

O procedimento sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. É determinada a razão sinal/ruído por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado e quantificado. A razão sinal/ruído com valor 3 é geralmente considerada aceitável para estimar o LD e com valor 10 para estimar o LQ (BRASIL, 2003; BRITO *et al.*, 2003 apud CALDAS, 2009).

O LD e o LQ são expressos como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão devem ser consideradas (BRASIL, 2003).

### 3.4.4 Precisão

Precisão é a medida de quão próximo os resultados estão uns dos outros, ou seja, é o grau de concordância entre os resultados de cada teste quando aplicado repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra, e é geralmente

expressa como desvio padrão, variância ou coeficiente de variação de diversas medidas (EURACHEM, 1998; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

Uma forma de expressar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD%) (Equação 2), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

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

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto

X<sub>m</sub> = média de uma série de medidas (replicatas)

Métodos que quantificam compostos em quantidades macro requerem valores de RSD de 1 a 2%. 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.

A repetitividade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (mesmo equipamento, analista, reagentes e dia) em pequeno espaço de tempo (BRITO *et al.*, 2003 apud CALDAS, 2009; RIBANI *et al.*, 2004; VALENTINI, 2007). Pode ser avaliada, de acordo com o INMETRO, que recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão, ou de acordo com a ANVISA, que recomenda no mínimo nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja três diferentes concentrações e três replicatas cada, ou com no mínimo seis determinações para uma única concentração-teste (BRASIL, 2003). O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (INMETRO, 2007), sendo utilizado pelo INMETRO. A ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade.

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. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada (RIBANI *et al.*, 2004).

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.

#### 3.4.5 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 representa a existência de erros sistemáticos, e é um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico (PRIMEL, 2003). 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.

#### 3.4.6 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.

### 3.5 Efeito Matriz

A complexidade das amostras e o número de compostos que co-eluem com elas acabam gerando um problema durante a análise, denominado efeito matriz. Este efeito pode ser notado pela significativa diferença de resposta obtida em padrões preparados no solvente daqueles preparados no extrato da matriz (PRESTES, 2007).

O efeito matriz pode gerar sérios problemas analíticos, devido a possível superestimação da concentração dos analitos (ZROSTLÌKOVÁ *et al.*, 2001) ou diminuição da resposta do detector de um analito presente no extrato da amostra comparado ao mesmo analito em solvente orgânico (HAJŠLOVÁ *et al.*, 1998; EURACHEM, 1998). 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).

Em GC, o efeito de matriz pode ocorrer nas seguintes partes do sistema cromatográfico: injetor, coluna ou detector. No injetor, o *liner* (tubo de vidro) é o principal responsável pelo efeito de matriz, pois os sítios ativos deste material podem adsorver ou induzir a degradação térmica de alguns analitos, promovendo assim o enriquecimento do sinal (SHENCK e LEHOTAY, 2000).

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).

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).

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 insersores 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 (DIAS, 2010).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de método utilizando GC-MS para análise do perfil graxo do biodiesel de tungue e de blendas tungue:soja em diferentes proporções.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

#### 4.1 Instrumentação

✓ GC-MS-QP 2010 Plus Shimadzu equipado com injetor split/splitless; auto-injetor AOC-20i, fonte de ionização por Impacto de Elétrons (EI) e filtro de massa quadrupolo; coluna capilar de sílica fundida: Rtx®-5MS (Restek) com dimensões 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura do filme e aquisição de dados pelo software GC Solution version 2 Shimadzu;

✓ Balança Analítica Bioprecisa modelo FA 2104N;

#### 4.2 Reagentes, solventes e materiais

- ✓ Hexadecanoato de metila, pureza 99,9%, Supelco, EUA;
- ✓ Heptadecanoato de metila, pureza 99,8%, Supelco, EUA;
- ✓ Linolenato de metila pureza, 99,9%, Supelco, EUA;
- ✓ Octadecanoato de metila, pureza 99,9%, Supelco, EUA;
- ✓ Heneicosanoato de metila, pureza 99,6%, Supelco, EUA;
- ✓ Docosanoato de metila, pureza 99,7%, Supelco, EUA;
- ✓ Linoleato de metila, pureza 99,7%, Supelco, EUA;
- ✓ Octadecenoato de metila, pureza 99,7%, Supelco, EUA;
- ✓ Eicosenoato de metila, pureza 99,0%, Supelco, EUA;
- ✓ Tricosanoato de metila, pureza 99,8%, Supelco, EUA;
- ✓ Hexano, solvente HPLC e espectrofotométrico, J.T.Baker, EUA;
- ✓ Extran® neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Gás Hélio para GC, pureza 99,999%;
- ✓ Micro-seringas de vidro com capacidade de 10 µL, 50 µL e 250 µL, Hamilton CO., Reno, Nevada, EUA;
- ✓ Balões volumétricos de 1 mL, 5 mL e 10 mL;
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 5000 µL) (Labmate, Polônia, Digipet);

- ✓ Pipetas de Pasteur;
- ✓ Frasco 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 metílico de tungue foram preparadas na concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Através de diluições sucessivas foram preparadas novas soluções individuais de 10 e  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . E a partir das soluções individuais de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  foram preparados, primeiramente, uma mistura de todos os ésteres selecionados na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  mais o padrão interno (tricosanoato de metila) de  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  (M8 +PI) para a realização das etapas de otimização do GC, e posteriormente, para a curva de calibração, com exceção dos três últimos níveis, que foram utilizadas as soluções de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . O solvente utilizado para os procedimentos descritos acima foi o n-hexano.

#### **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 de tungue e diferentes misturas tungue: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 da amostra**

Para a análise de ésteres graxos por Cromatografia Gasosa não há necessidade de preparo de amostra, pois os ésteres formados a partir da reação de transesterificação já estão derivatizados. Além disso, o biodiesel é lavado três vezes

com água e posteriormente seco com sulfato de magnésio, o que minimiza o risco de contaminantes na análise.

Faz-se, portanto, somente a diluição da amostra. Para tal, 2  $\mu\text{L}$  biodiesel foi adicionado em um balão de 10 mL (1:5000 (v/v)), e em seguida, adicionou-se 0,75 mL de padrão interno (tricosanoato de metila com concentração de 100  $\text{mg L}^{-1}$ ) e completou-se o balão com n-hexano.

## 4.6 Otimização do sistema cromatográfico GC-MS

A estabilidade térmica e a volatilidade dos ésteres graxos presentes no biodiesel foram aspectos predominantes na escolha do sistema cromatográfico. O método de referência EN 14103 para análise de FAME's indica a utilização do GC-FID para as análises. Mas a inexistência do principal padrão de éster graxo (éster  $\alpha$ -eleostearico) fez com que fosse necessária a utilização da espectrometria de massas para a confirmação dos resultados.

### 4.6.1 Programação de temperatura do forno

A programação de temperatura do forno cromatográfico foi o primeiro parâmetro a ser otimizado. Foram testadas programações isotérmicas e com aumento de temperatura programado. Para a realização dos testes foi utilizada a mistura dos oito ésteres graxos e do padrão interno: hexadecanoato de metila, octadecanoato de metila, octadecenoato de metila, linoleato de metila, linolenato de metila, eicosenoato de metila, heneicosanoato de metila, docosanoato de metila de 10  $\text{mg L}^{-1}$  e tricosanoato de metila na concentração de 7,5  $\text{mg L}^{-1}$  (M8 +PI). Para escolher a melhor programação foi avaliada a separação cromatográfica dos oito ésteres graxos.

### 4.6.2 Fluxo de gás de arraste

Para selecionar o melhor fluxo do gás de arraste a ser empregada na separação cromatográfica dos compostos, injetou-se 1  $\mu\text{L}$  da solução M8+PI

contendo 10 e 7,5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, com a programação de temperatura do forno previamente otimizada. Foram testados fluxos do gás de 0,6, 0,8 e 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A escolha do fluxo do gás de arraste foi baseada na melhor separação cromatográfica dos padrões.

#### 4.6.3 Temperatura do injetor e modo de injeção

O injetor *split/splitless* foi utilizado. O modo de injeção *split* foi escolhido por estar de acordo com as características da amostra, ou seja, em caso de amostras concentradas. No modo *split*, a amostra é vaporizada e injetada na corrente de gás de arraste, e apenas uma parte da amostra é direcionada para a cabeça da coluna cromatográfica. A otimização da razão *split* foi realizada diferentemente dos outros parâmetros otimizados, utilizando 1 µL da amostra preparada conforme item 4.5, ao invés do M8+PI de 10 e 7,5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, para que fosse levado em conta o perfil diferenciado da amostra, sendo testadas razões: 1:10, 1:30, 1:50, 1:100.

A temperatura do injetor deve ser suficientemente elevada para que a amostra vaporize-se imediatamente, mas que não favoreça a decomposição da mesma. Geralmente admite-se a temperatura de injeção como 50 °C acima da temperatura de ebulição do composto menos volátil. Foram testadas três temperaturas para o injetor: 200, 250 e 280 °C.

#### 4.6.4 Temperatura da interface

Para otimizar a temperaturas da interface foram efetuados testes com duas diferentes temperaturas, 250 e 280° C. A solução M8+PI de 10 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> foi utilizada para os testes.

#### 4.6.5 Temperatura da fonte de ionização

A fim de escolher a temperatura da fonte de ionização ideal, testes com quatro diferentes temperaturas foram testadas, 200, 230, 260 e 280 °C, utilizando a mistura M8+PI de 10 e 7,5 mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.7 Validação do método

Os parâmetros utilizados para a validação do método analítico foram: curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão através de ensaios de adição padrão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2003).

##### 4.7.1 Curva analítica e linearidade

As curvas analíticas para a mistura M8 foram construídas com um total de sete níveis de concentração, 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; e 20,0 mg L<sup>-1</sup>. Foi empregada a padronização interna, utilizando o tricosanoato de metila como padrão interno, na concentração de 7,5 mg L<sup>-1</sup>.

Cada nível de concentração foi injetado três vezes no sistema cromatográfico. A partir disso, o *software* constrói 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 correlação linear (Coeficiente de Pearson) (*r*).

##### 4.7.2 Seletividade

A seletividade do método foi assegurada através da avaliação dos tempos de retenção e espectros de massa obtidos para cada composto através da injeção individual no sistema cromatográfico, que foram comparados com os espectros obtidos na mistura M8 (para verificação de cada composto na mistura, comprovando

a não-coeluição dos compostos) e posterior comparação com da biblioteca *NIST versão 06* para a total segurança da seletividade do método.

#### 4.7.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram avaliados segundo o método da relação sinal/ruído ( $s/n$ ), que estabelece um  $s/n \geq 3$  para o LD e  $s/n \geq 10$  para o LQ. No GC-MS a relação sinal/ruído foi comprovada experimentalmente e também calculada pelo *software* do equipamento.

#### 4.7.4 Precisão

O estudo da precisão do método, em termos de precisão intermediária, foram realizados utilizando três ensaios para cada nível de concentração escolhido (1º nível, 3º nível, 5º nível, 7º nível) com injeções realizadas em triplicata para cada ensaio, resultando em nove injeções para cada nível. Para avaliar a precisão intermediária, o procedimento foi realizado em dias diferentes.

A precisão instrumental foi avaliada para quatro (1º nível, 3º nível, 5º nível e 7º nível) dos sete níveis de concentração da curva analítica de cada composto, considerando dez injeções repetitivas de um mesmo ensaio.

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

#### 4.7.5 Exatidão

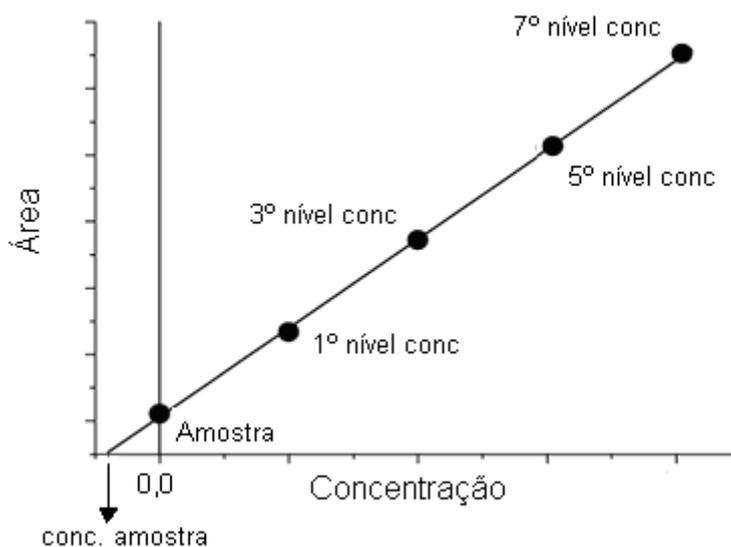
A exatidão foi verificada pelo método de adição padrão, uma vez que os analitos fazem parte da composição da matriz, não sendo possível obter a matriz isenta dos compostos de interesse.

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 (4) e (5).

Com a falta do material de referência, a concentração de cada composto na amostra não fortificada foi determinada através do método de adição padrão para posterior cálculo da exatidão. Para tal, os 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 11.



**Figura 11 - Modelo de curva utilizado no método de adição padrão**

A concentração encontrada na amostra através da extrapolação da reta, Figura 11, no eixo das abscissas foi definido como a concentração na amostra não fortificada e foi substituído na Equação (4).

$$\text{Conc det amostra fortificada} = \frac{\text{conc amostra não fortificada} \times (\text{área amostra fortificada} - \text{área amostra não fortificada})}{\text{área amostra não fortificada}} \quad (4)$$

Após o valor encontrado foi substituído na Equação (5).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{conc determinada na amostra fortificada}}{\text{concentração da fortificação}} \times 100 \quad (5)$$

Logo, quando o padrão interno foi considerado no cálculo da exatidão a reta, (Figura 11) relacionou a razão de áreas (área do padrão/área do padrão interno) com a razão das concentrações (concentração do padrão/concentração do padrão interno).

#### 4.7.6 Robustez

A robustez foi avaliada frente à variação da matriz. O estudo foi realizado com biodiesel metílico de tungue, blendas tungue:soja e biodiesel metílico de soja.

### 4.8 Avaliação do Efeito Matriz

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

As curvas na matriz foram preparadas da seguinte forma: em 2 µL de amostra foram adicionados 0,25; 0,5; 7,5, e 1,0 mL de cada padrão com concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> e 0,125; 0,15 e 0,20 da concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> em diferentes balões de 10 mL para a construção da curva com os respectivos níveis: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 20,0 mg L<sup>-1</sup>. Também foi adicionado em cada balão 0,75 mL do padrão interno (tricosanoato) com concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>. Os balões foram preenchidos até a marca com n-hexano. Além disso, uma amostra “branco” foi realizada sem adição de padrões, apenas o padrão interno foi adicionado.

O efeito matriz foi calculado através da Equação 6, conforme:

$$\text{Efeito matriz \%} = \frac{\text{slope (X1)} - \text{slope (X2)}}{\text{slope (X2)}} \times 100 \quad (6)$$

onde:

$X_1$ = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada éster, preparadas no biodiesel de tungue (matriz);

$X_2$ = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada éster, preparadas em n-hexano (solvente);

#### **4.9 Aplicação do método**

Para a aplicação do método foram utilizadas amostras de biodiesel de tungue produzidos pelo Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Rio Grande. A amostragem foi realizada aleatoriamente. A aplicabilidade do método também foi investigada utilizando blendas de tungue:soja, nas proporções 15:85, 20:80 e 25:75 (tungue:soja).

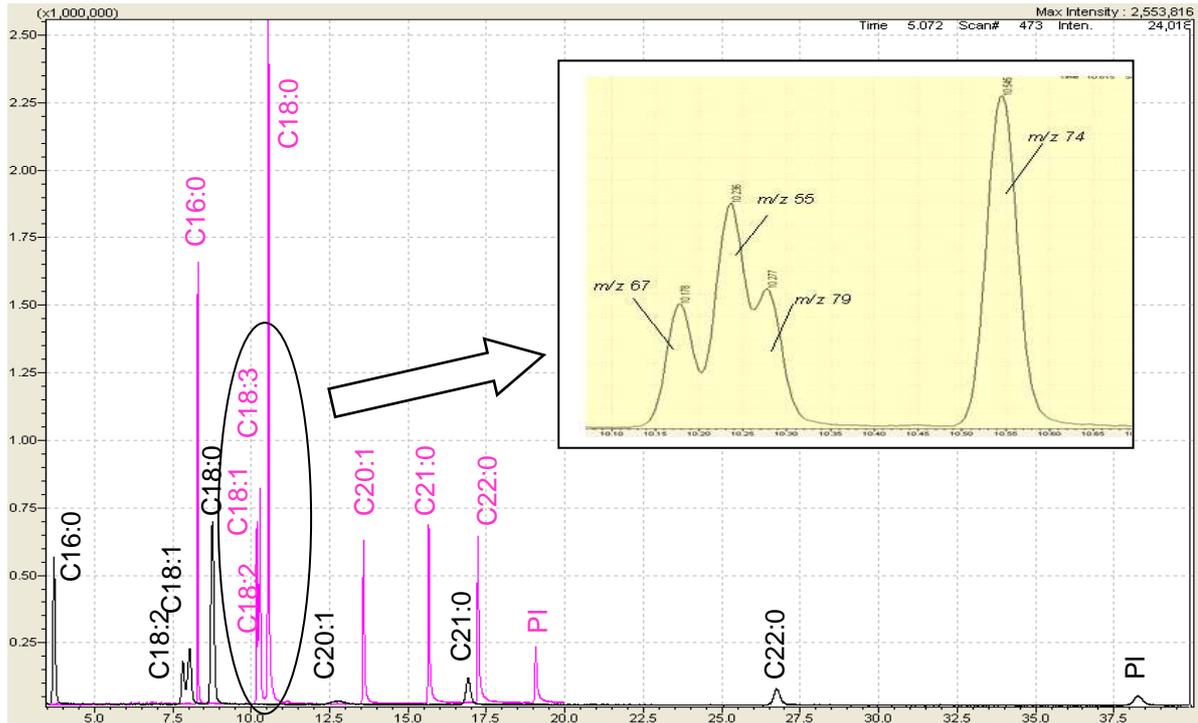
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Otimização das condições cromatográficas no GC-MS

#### 5.1.1 Programação da temperatura do forno cromatográfico

Depois do tipo de fase estacionária, a temperatura da coluna é o fator que mais afeta a separação (COLLINS, 2006). Diferentes temperaturas no forno cromatográfico foram testadas com o intuito de obter dentro do menor tempo possível, a melhor separação dos compostos. Quando testou-se a programação isotérmica a 200 °C (conforme a EN 14103), o tempo de corrida ficou muito longo (migração na coluna muito lenta devido à baixa pressão de vapor dos constituintes pela baixa temperatura adotada) e os picos saíram distantes um do outro e com baixa resolução, pois quanto maior o tempo de permanência do composto na coluna, maior foi a largura da base do pico. Quanto maior a pressão de vapor, maior será a tendência do composto de permanecer vaporizada e assim elui rapidamente, por isso a programação de temperatura foi adotada, para a melhor vaporização dos compostos.

A figura 12 compara as corridas obtidas com a temperatura isotérmica (200 °C) e com a programação de temperatura otimizada. O tempo total de corrida para a programação isotérmica foi de 40 minutos enquanto o tempo de corrida para a programação de temperatura do forno foi de 20 minutos. A sensibilidade também foi melhorada com a otimização da temperatura, que pode ser observada pela diferença das intensidades do sinal e área obtida para cada composto, utilizando a mesma solução M8+PI. As áreas foram relacionadas para a comprovação da diferença de sensibilidade.



**Figura 12 – Comparação dos cromatogramas obtidos pela programação isotérmica do forno a 200 °C (preto) e pela programação de temperatura otimizada (rosa), destacando a separação dos três compostos que coeluem**

Utilizando a programação do forno cromatográfico otimizado, tempos de corrida menores foram obtidos. O maior problema encontrado foi na separação dos três ésteres com 18 carbonos e que possuem insaturação (linolenato de metila, octadecenoato de metila, linoleato de metila) que eluem em tempos muito próximos, como mostrado na figura 12. Entretanto, os fragmentos gerados para cada pico são bem diferentes, distinguindo assim claramente um pico do outro.

A tabela 4 mostra as programações de temperatura do forno realizadas. Após testes com diferentes programações do forno cromatográfico, a programação otimizada foi a seguinte: 130 °C por 2 minutos, 20 °C min<sup>-1</sup> até 220 °C, 0,5 °C min<sup>-1</sup> até 223 °C e 7 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C por 3 minutos, resultando em um tempo total de análise de 20 minutos.

Em todas as programações testadas houve co-eluição dos compostos, até mesmo na programação isotérmica indicada pela norma. A melhor maneira de resolver o problema da co-eluição de ésteres graxos é a utilização da coluna específica para análise de FAME's. Entretanto, na falta da coluna ideal, a

espectrometria de massas soluciona o problema na identificação e confirmação dos resultados.

**Tabela 4 - Testes com diferentes programações de temperatura do forno cromatográfico**

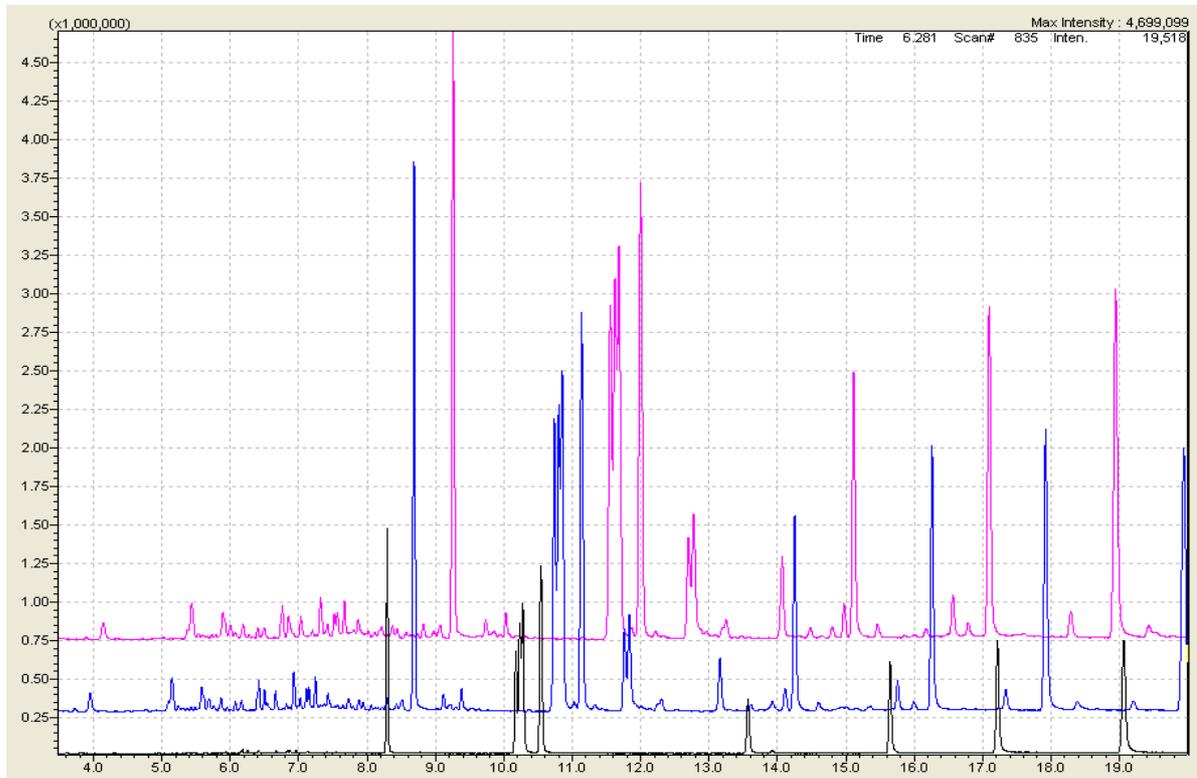
Programação	Tempo de corrida	Observações
100 °C por 3 min, 10 °min <sup>-1</sup> até 235 °C, 2 °C min <sup>-1</sup> até 245 °C, 25 °C min <sup>-1</sup> até 300 °C por 5 min.	29 minutos	muito ruído na linha de base ausência de compostos e coeluição
100 °C por 3 min, 10 °min <sup>-1</sup> até 235 °C, 1 °C min <sup>-1</sup> até 245 °C, 25 °C min <sup>-1</sup> até 300 °C por 5 min.	34 minutos	picos coeluídos não saíram todos os compostos
100 °C por 3 min, 10 °min <sup>-1</sup> até 230 °C, 1 °C min <sup>-1</sup> até 240 °C, 10 °C min <sup>-1</sup> até 260 °C por 2 min.	30 minutos	quatro compostos coeluídos
130 °C por 2 min, 10 °min <sup>-1</sup> até 180 °C por 20 min, 5 °C min <sup>-1</sup> até 220 °C, 30 °C min <sup>-1</sup> até 250 °C por 5 min.	41 minutos	15 minutos até a saída do primeiro composto tempo de corrida muito longo
130 °C por 2 min, 20 °min <sup>-1</sup> até 220 °C, 0,5 °C min <sup>-1</sup> até 230 °C, 10 °C min <sup>-1</sup> até 260 °C por 2 min.	30,5 minutos	tentativa de diminuir tempo do primeiro composto tempo longo de corrida
130 °C por 2 min, 20 °min <sup>-1</sup> até 220 °C, 0,5 °C min <sup>-1</sup> até 225 °C, 10 °C min <sup>-1</sup> até 240 °C por 10 min.	28 minutos	três compostos coeluídos final da corrida sem eluição de compostos
130 °C por 2 min, 20 °min <sup>-1</sup> até 220 °C, 0,5 °C min <sup>-1</sup> até 223 °C, 7 °C min <sup>-1</sup> até 240 °C por 10 min.	25 minutos	tentativa de diminuir o tempo final da corrida
130 °C por 2 min, 20 °min <sup>-1</sup> até 220 °C, 0,5 °C min <sup>-1</sup> até 223 °C, 7 °C min <sup>-1</sup> até 250 °C por 3,6 min.	20 minutos	boa separação de compostos, com coeluição, bom tempo de corrida

### 5.1.2 Fluxo de gás de arraste

O gás de arraste (fase móvel) é o que levará as substâncias presentes na amostra para fora da coluna, quando elas não estiverem interagindo com a fase estacionária. O controle da vazão do gás de arraste é efetuado por reguladores de pressão e/ou controladores de fluxo (COLLINS, 2006).

Geralmente, em análises utilizando hélio como gás de arraste, são empregadas vazões de 1mL min<sup>-1</sup> (COLLINS, 2006). Contudo, foram testados vazões menores, a fim de tentar uma melhor separação dos três ésteres que eluem

muito próximos. Os testes mostraram que a separação dos três ésteres não foi afetada pela diminuição da vazão, como ilustra a figura 13 escolhendo assim a vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  por apresentar menor tempo de análise.

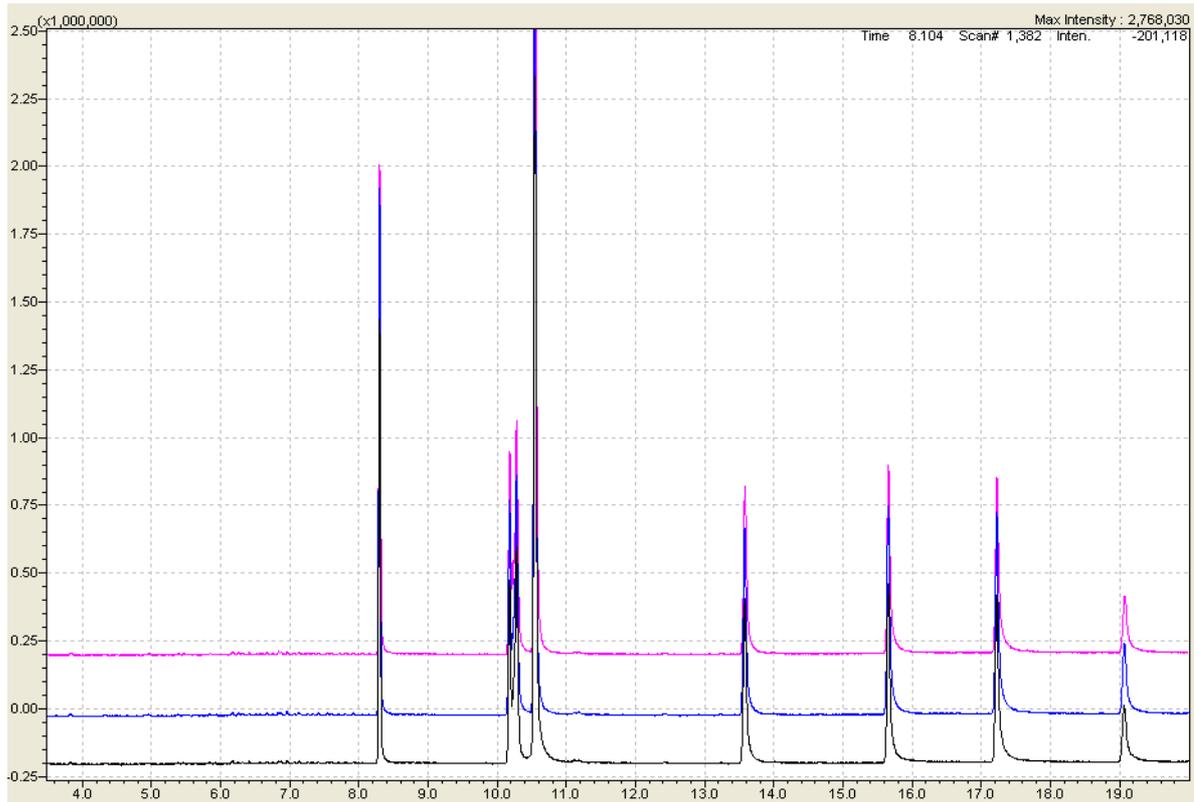


**Figura 13- Cromatogramas com diferentes fluxos de gás de arraste: em preto  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , em azul  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  e em rosa  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$**

### 5.1.3. Temperatura do injetor e modo de injeção

O injetor deve estar aquecido a uma temperatura acima do ponto de ebulição dos componentes da amostra, para que a amostra se volatilize completa e instantaneamente e seja carregada para a coluna. Se a temperatura for excessivamente alta, pode ocorrer decomposição da amostra. A amostra deve entrar na coluna na forma de um segmento estreito, para evitar alargamento dos picos (AUGUSTO, 2000).

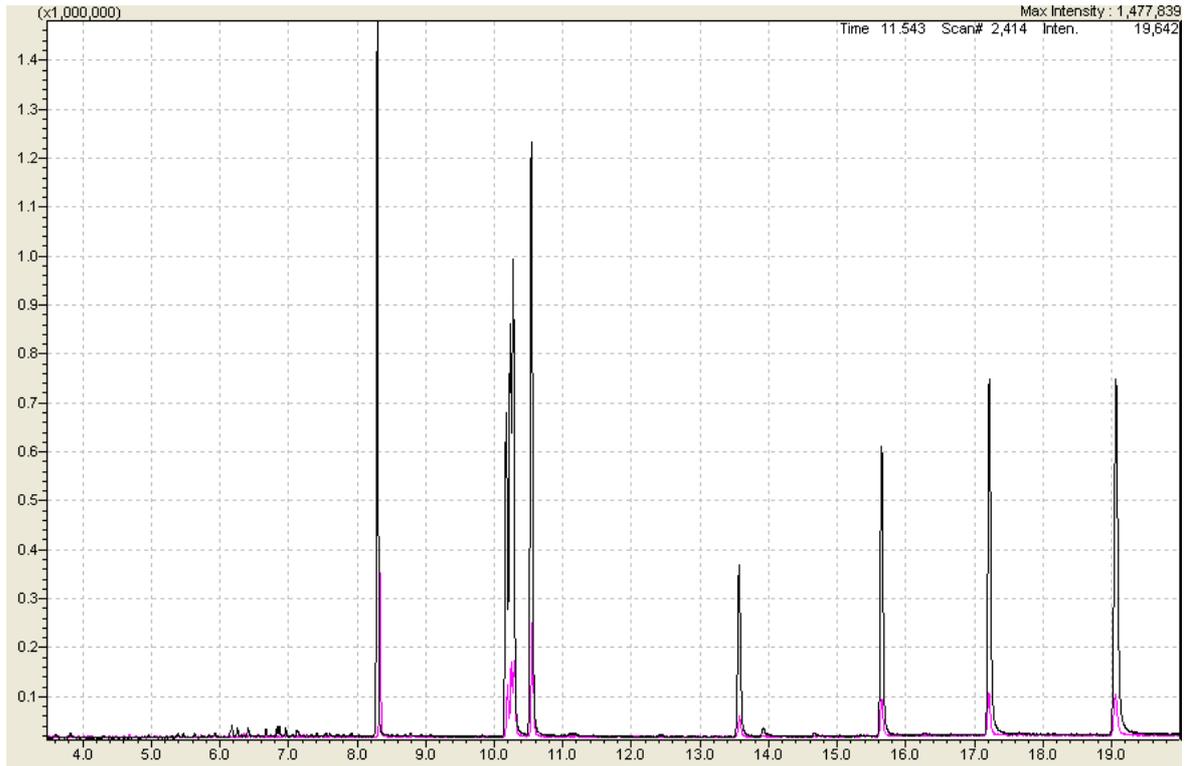
Testes com temperatura do injetor foram realizados, mostrando que a temperatura do injetor escolhida para o desenvolvimento deste método foi  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ . A figura 14 mostra os cromatogramas comparando as três temperaturas.



**Figura 14 – Cromatogramas com diferentes temperaturas de injeção: 200 °C (rosa), 250 °C (preto) e 280 °C (azul)**

Os testes com a temperatura do injetor demonstraram que não houve influência significativa utilizando as três temperaturas. As áreas de cada padrão foram comparadas para comparar que não houve influência em relação à sensibilidade do método. A temperatura de 250 °C foi escolhida por ser a temperatura indicada pelo método.

Nos testes com o modo de injeção *split*, as diferentes proporções (1:10, 1:30, 1:50, 1:100) testadas servem para que a amostra seja fracionada (diluída), diminuindo a possibilidade de contaminação da coluna e do detector, e facilitando a análise no sentido de diluição de possíveis interferentes (contaminantes). A razão *split* otimizada foi 1:30. Também foi testado o modo de injeção a alta pressão em 300 kPa (*high pressure injection*) e sem alta pressão. Como pode ser observado na figura 15, a injeção a alta pressão melhora satisfatoriamente a intensidade do sinal medido, tornando-o assim mais sensível.

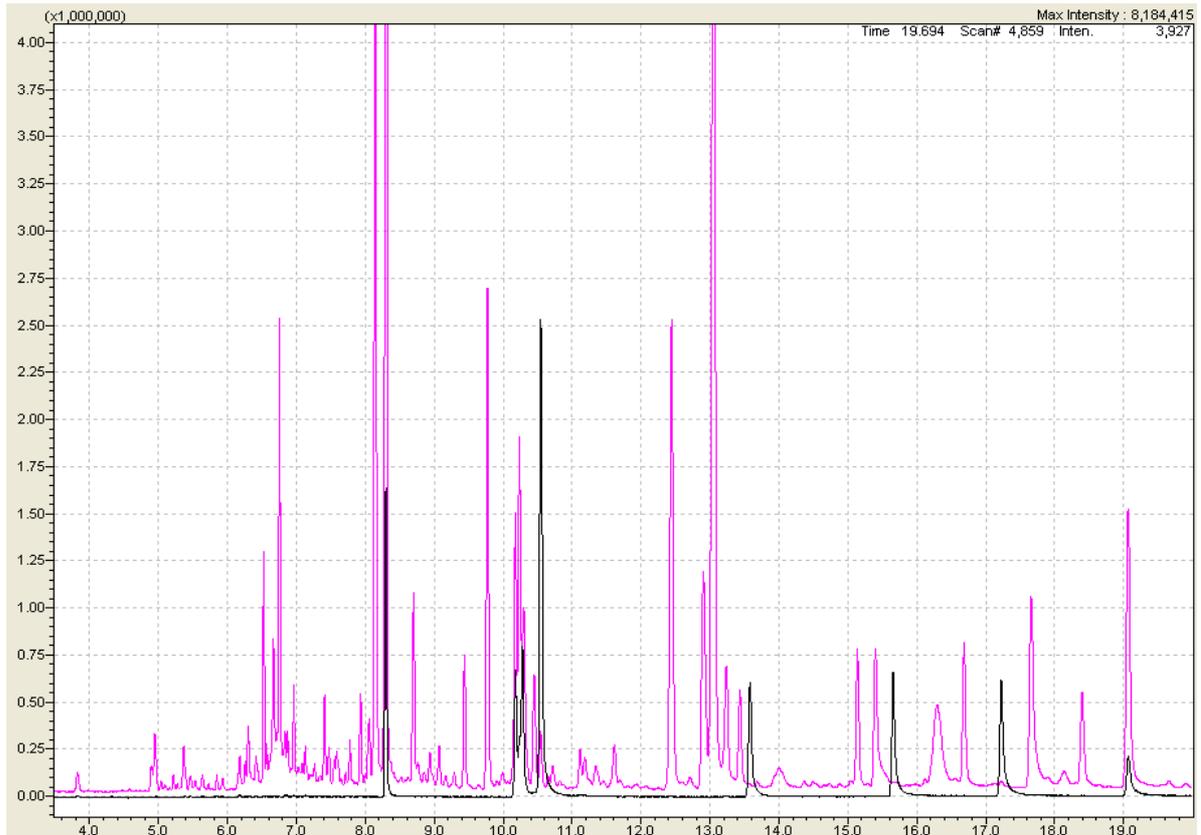


**Figura 15- Testes com injeção a alta pressão (em preto) e sem alta pressão (em rosa)**

#### 5.1.4 Temperatura da interface

Para que a temperatura ideal da interface seja estabelecida, é preciso entender que a mesma possui grande importância para a análise por espectrometria de massas. A otimização da temperatura deve ser feita afim de que a substância que se pretende analisar não condense na interface, e tampouco se decompõe antes de entrar no espectrômetro de massas. Com isso, deve-se estabelecer uma temperatura “intermediária”, nem muito alta e nem muito baixa, para que o método obtenha os melhores resultados.

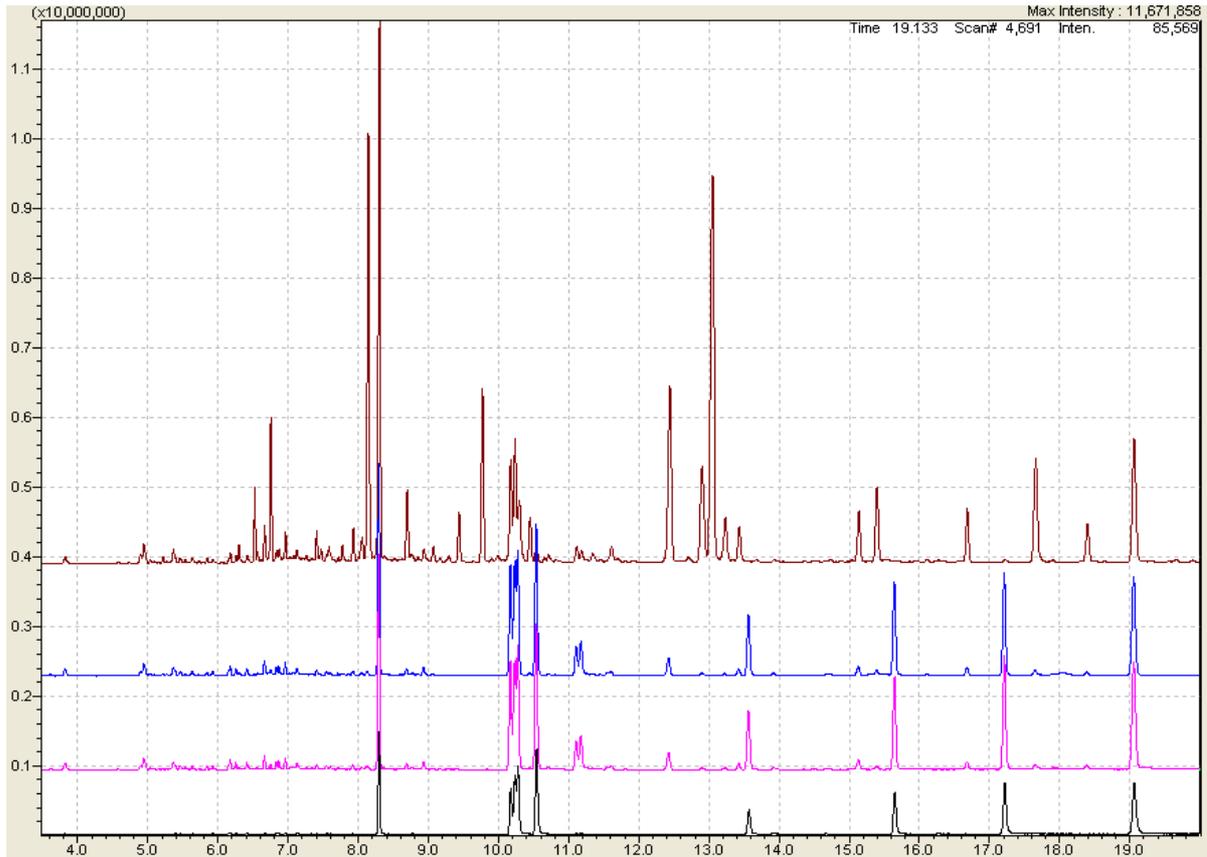
A figura 16 demonstra os testes realizados com duas temperaturas da interface diferentes. Pode-se observar que, apesar da maior temperatura (280 °C, em rosa) aumentar a sensibilidade do método no que diz respeito à intensidade do sinal medido, a decomposição dos padrões é visível, uma vez que diversos picos surgem no cromatograma. É importante salientar que a mesma mistura M8+PI de 10 e 7,5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, foi utilizada para os testes.



**Figura 16 - Testes com diferentes temperaturas da interface: em rosa 280 °C e em preto 250 °C**

#### 5.1.5 Temperatura da fonte de ionização

Para a otimização da temperatura da fonte de ionização, quatro diferentes temperaturas foram testadas (200 °C, 230 °C, 260 °C, 280°C). Os testes foram realizados com a mistura M8 dos padrões com concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>. Como pode ser observado na figura 17, a melhor temperatura foi 200 °C, pois temperaturas maiores ocasionaram tanto o aumento da intensidade do sinal quanto o surgimento de outros picos, provavelmente provenientes da degradação térmica dos padrões, fato similar aos testes realizados com a temperatura da interface.



**Figura 17- Cromatograma dos testes para otimização da temperatura da fonte de ionização: 280 °C (marrom), 260°C (azul), 230 °C (rosa) e 200 °C (preto)**

### 5.6 Resumo das condições cromatográficas otimizadas

Em síntese, as melhores condições obtidas para o método desenvolvido para a determinação do perfil graxo do biodiesel de tungue, estão descritas nas tabelas 5 e 6.

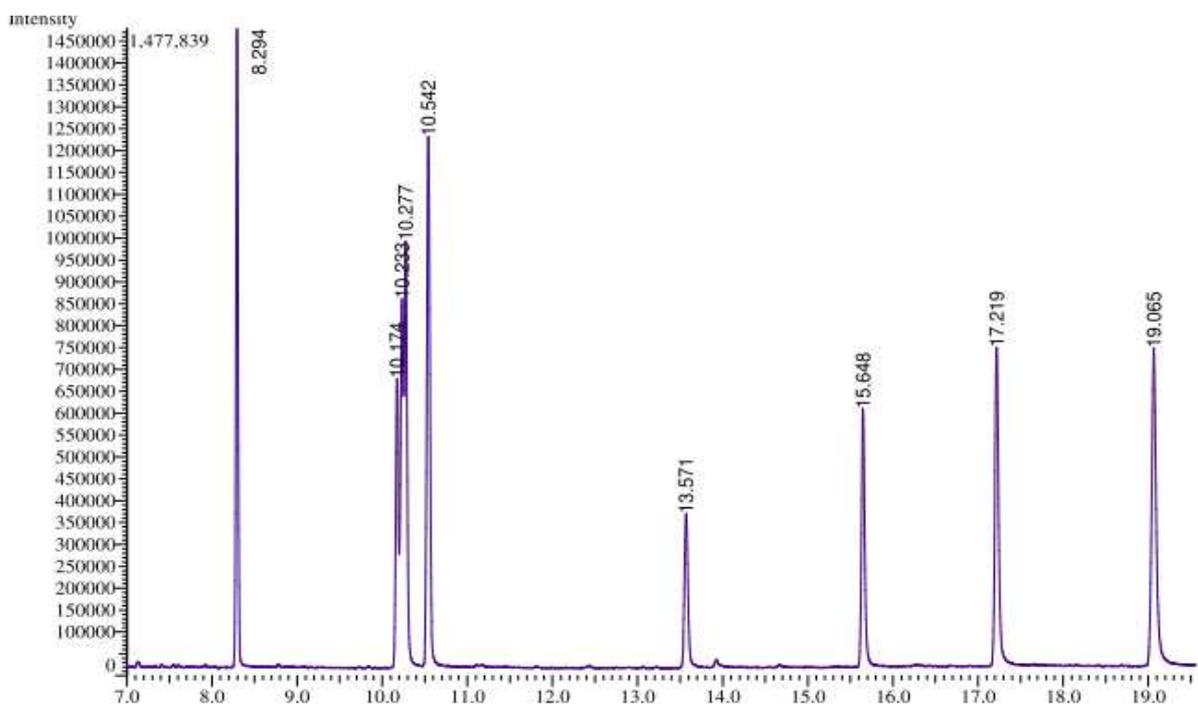
**Tabela 5 – Programação da temperatura do forno cromatográfico otimizada**

Taxa (°C/min.)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min.)
0,0	130,0	2,0
20,0	220,0	0,0
0,5	223,0	0,0
7,0	250,0	3,0

**Tabela 6 – Condições cromatográficas otimizadas para o método utilizando GC-MS**

<b>GC</b>	
coluna capilar	RTX 5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m)
volume de injeção	1 $\mu$ L <i>high pressure</i> (300 pKa)
temperatura do injetor	250 $^{\circ}$ C
razão <i>split</i>	1:30
fluxo de He	1 mL min <sup>-1</sup>
<b>MS</b>	
temperatura da fonte	200 $^{\circ}$ C
temperatura da interface	250 $^{\circ}$ C
modo MS	<i>full scan</i>
fonte de ionização	EI (70 eV)
intervalo de massas	30 a 500 <i>m/z</i>

Utilizando a programação descrita na tabela 5, o tempo total de corrida é de 20 minutos. Foi utilizado *solvent cut time* de 4 minutos para que ocorra a saída do solvente do sistema cromatográfico sem ser detectado, a fim de evitar possíveis contaminações do detector. Um cromatograma da mistura de padrões M8 com as melhores condições cromatográficas para o método pode ser visto na figura 18.



**Figura 18 – Cromatograma da mistura de padrões M8 com as melhores condições cromatográficas para o método**

## 5.2 Validação do método

### 5.2.1 Curva analítica e linearidade

Os parâmetros de linearidade obtidos para os compostos em estudo estão descritos na tabela 7.

**Tabela 7 - Resultados obtidos para calibração dos ésteres graxos**

Éster Graxo	Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	R	Equação da reta
Éster Palmítico	2,5 - 20,0	0,9928	$y = 0,204x + 0,176$
Éster Esteárico	2,5 - 20,0	0,9983	$y = 0,215x + 0,719$
Éster Oléico	2,5 - 20,0	0,9965	$y = 0,334x + 0,103$
Éster Linoléico	2,5 - 20,0	0,9986	$y = 0,175x - 0,204$
Éster Linolênico	2,5 - 20,0	0,9988	$y = 0,193x - 0,148$
Éster Eicosenóico	2,5 - 20,0	0,9982	$y = 0,196x - 0,344$
Éster Heneicosanóico	2,5 - 20,0	0,9977	$y = 0,190x - 0,091$
Éster Behênico	2,5 - 20,0	0,9989	$y = 0,418x - 0,433$

Através dos valores obtidos para a construção da curva analítica, pode-se concluir que o modelo de regressão linear mostrou-se adequado para as determinações analíticas em estudo, uma vez que os coeficientes de correlação (r) foram maiores que 0,9928. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação de no mínimo 0,99 e o INMETRO acima de 0,90.

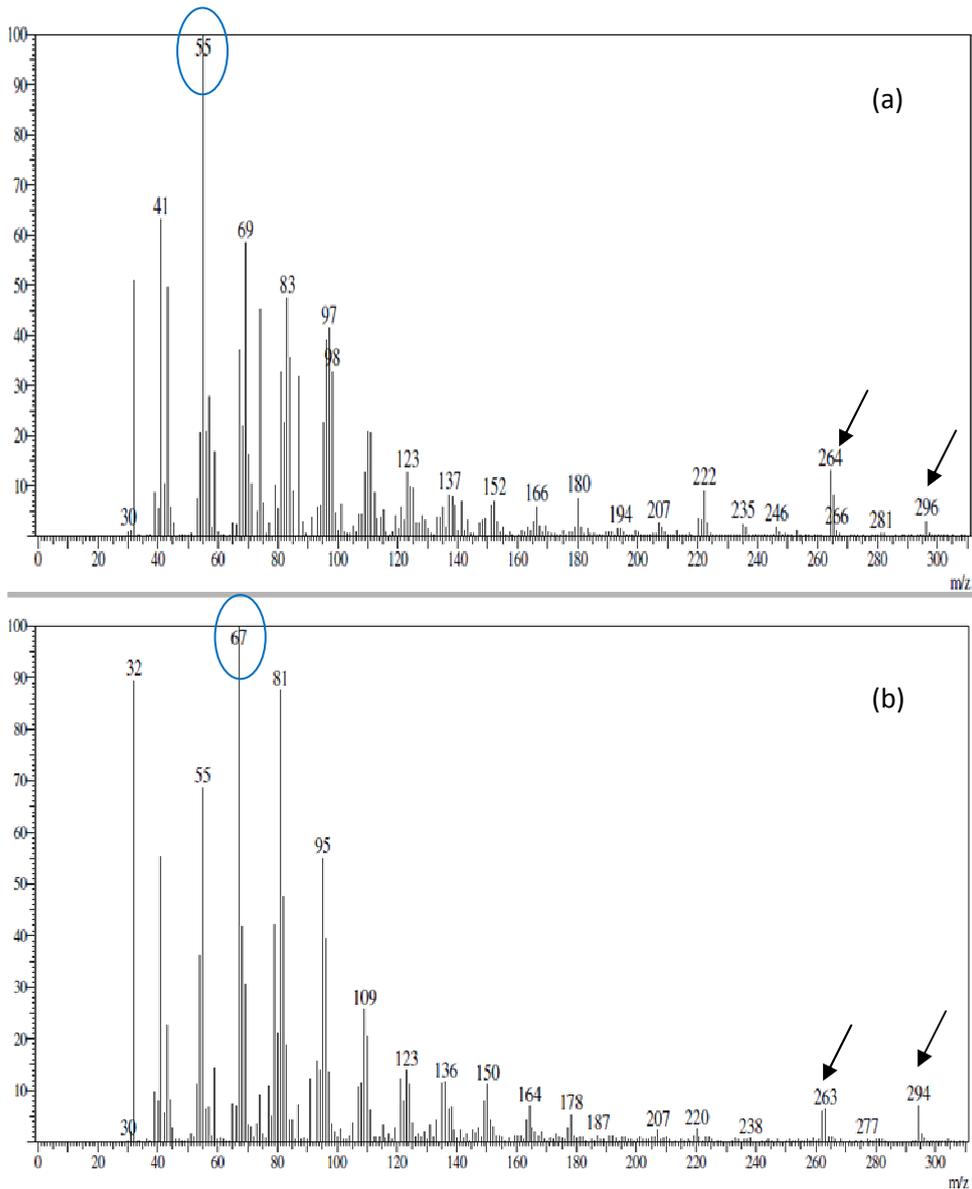
### 5.2.2. Seletividade

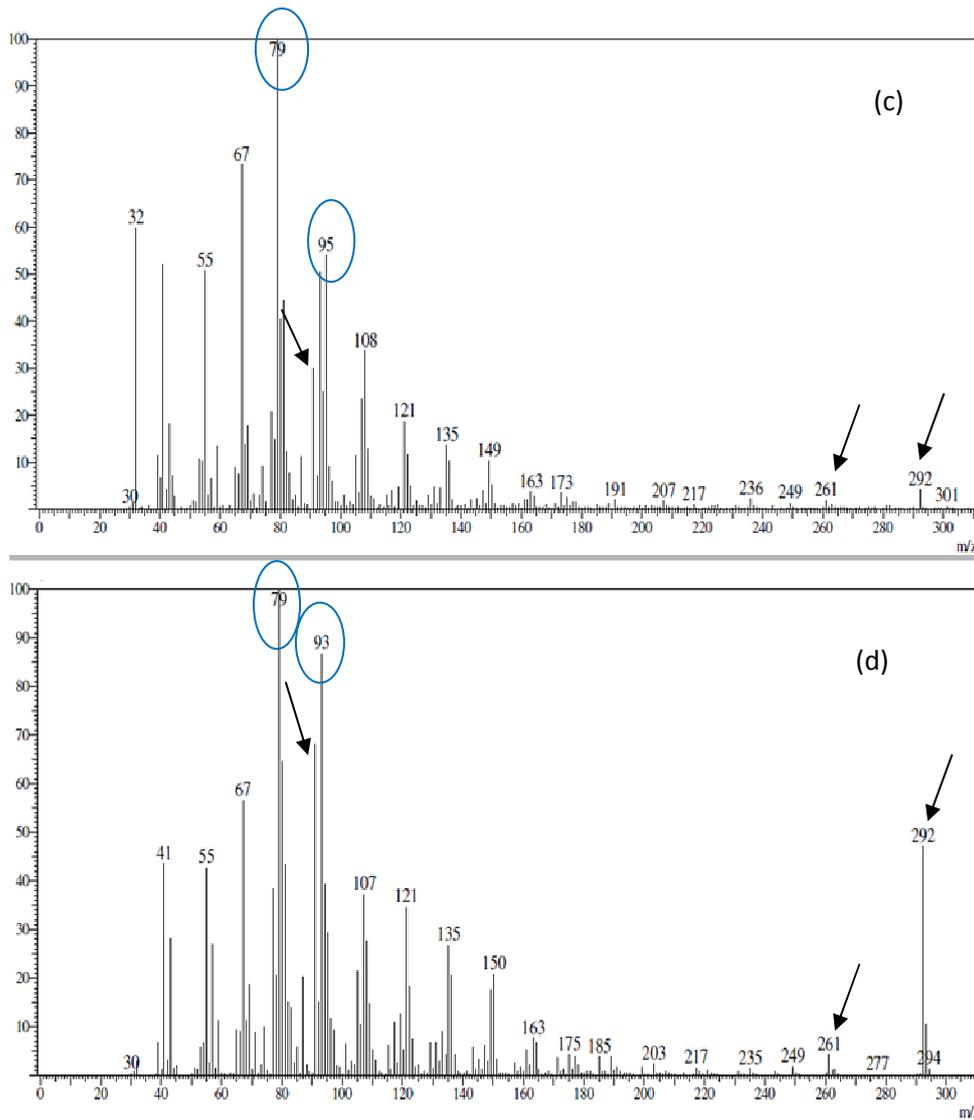
O método mostrou-se seletivo para os compostos em estudo, mostrando-se capaz de determinar qualitativamente cada composto utilizando os tempos de retenção e, garantindo que o pico obtido no cromatograma seja exclusivo ao composto de interesse através da análise dos espectros de massa.

As fragmentações obtidas foram comparadas com a biblioteca *NIST versão 06* para a confirmação dos resultados. Os modelos de fragmentação dos ésteres

também estão de acordo com QIN e colaboradores (2007), que descrevem a fragmentação de éster com diferentes saturações.

Os ésteres com 18 carbonos e diferentes saturações foram identificados pelos seus respectivos espectros, uma vez que no cromatograma houve uma pequena sobreposição de picos dos três compostos insaturados, e os picos bases para mono, di e tri insaturados são diferentes, como pode ser observado na figura 19.





**Figura 19- Espectros de massas dos ésteres obtido no modo *scan* : (a) oléico, (b) linoléico, (c) linolênico e (d)  $\alpha$ -eleosteárico**

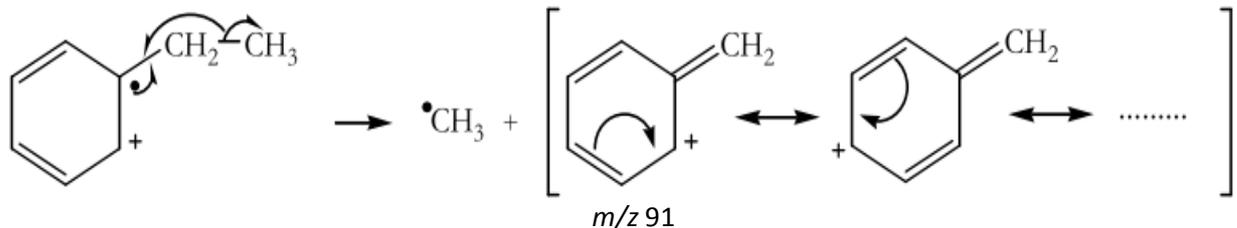
A fragmentação dos ésteres possui alguns íons característicos, tais como:

- ésteres mono insaturados possuem a razão  $m/z$  55 como pico base, e ainda  $[M-32]^+$  e o íon molecular, como mostrado na figura 19 (a);
- ésteres bi insaturados possuem a razão  $m/z$  67 como pico base, e  $[M-31]^+$  e o íon molecular, sendo exemplificado na figura 19 (b);
- já os ésteres poli insaturados possuem como pico base o íon de razão  $m/z$  79 e também os íons  $[M-31]^+$  e o íon molecular, conforme visto na figura 19 (c) e (d);
- os ésteres saturados possuem como fragmentos característicos o íon molecular e o  $[M-43]^+$ , além do pico base  $m/z$  74.

Também pode ser observado na figura 19 (c) e (d) que os isômeros também podem ser identificados pelos seus respectivos espectros, apesar de possuírem o mesmo pico base e fragmentações semelhantes. O espectro da figura 19 (d) é do ácido  $\alpha$ -eleosteárico, e como não há padrão, o mesmo foi obtido a partir de uma amostra de biodiesel de tungue. Assim, com a diferenciação dos espectros (c) e (d) a presença  $\alpha$ -eleosteárico foi confirmada.

Qin e colaboradores (2007) descrevem o modelo de fragmentação dos ésteres, que acontece de forma semelhante. Para ésteres saturados, por exemplo, ocorre o rearranjo de McLafferty e  $\alpha$ -clivagem para a formação do fragmento de  $m/z$  74. Para os mono insaturados a formação do fragmento de  $m/z$  55 é o resultado da transferência da dupla ligação e  $\alpha$ -clivagem. O mecanismo de fragmentação para os bi e poli insaturados também acontece através da transferência de duplas e  $\alpha$ -clivagem. Em todos os ésteres ocorre a clivagem da carbonila.

Para o ácido  $\alpha$ -eleosteárico, além da formação dos fragmentos característicos já evidenciados, existe a formação do íon tropílio, de  $m/z$  91, que acontece a partir de duplas ligações que estão conjugadas, ou ainda através da isomerização. A formação genérica do íon tropílio pode ser observada na figura 20.



**Figura 20 – Formação genérica do íon tropílio**

A identificação também foi confirmada pelos diferentes tempos de retenção, apresentados na tabela 8.

**Tabela 8 - Valores de tempo de retenção e desvio padrão relativo ( $RSD_{TR}\%$ ) para cada composto**

Éster	Fórmula	$t_R$	$RSD_{tr}\%$
pamítico (hexadecanoato)	C16:0	8,306	< 0,020
linoléico (linoleato)	C18:2	10,192	< 0,021
oléico (octadecenoato)	C18:1	10,249	< 0,021
linolênico (linolenato)	C18:3	10,293	< 0,022
esteárico (octadecanoato)	C18:0	10,560	< 0,017
$\alpha$ -eleosteárico	C18:3c	12,444	---
eicosenóico (eicosenoato)	C20:1	13,595	< 0,024
heneicosanóico (heneicosanoato)	C21:0	15,670	< 0,015
behênico (docosanoato)	C22:0	17,241	< 0,014

A tabela 8 apresenta os valores do tempo de retenção e respectivos RSD% para cada composto, todos com valores abaixo de 0,024%. Os valores do tempo de retenção e RSD's foram obtidos por meio de dez injeções repetitivas, sendo realizada conjuntamente com os testes de precisão (repetitividade). O único composto que não apresenta valor para o desvio padrão relativo é o ácido  $\alpha$ -eleosteárico, uma vez que as injeções foram realizadas com padrões. O tempo de retenção do ácido  $\alpha$ -eleosteárico foi obtido a partir da injeção de uma amostra de biodiesel de tungue.

A partir dos quatro dados obtidos (tempo de retenção, espectros de cada padrão, comparação com modelos de fragmentação e tabela *NIST*) pode-se concluir que a seletividade do método foi assegurada.

### 5.2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e quantificação do método estão descritos na tabela 9. Como não existem limites no regulamento dos ésteres presentes em biodiesel, não há parâmetros para referência. Os limites do método são os mesmos do instrumento para os compostos em estudo, uma vez que não há etapas de preparo e pré-concentração de amostra.

É importante salientar que os valores de LOD e LOQ foram obtidos utilizando a mistura M8 para que os efeitos dos outros ésteres sejam considerados na análise, o que aproxima o método das análises de amostras reais, pois provavelmente LOQ's menores possam ser obtidos a partir de injeções realizadas individualmente. Os resultados obtidos poderão servir de dados preliminares para estudos posteriores e/ou contribuir para a retificação das normas oficiais.

**Tabela 9 – Resultados de LOD e LOQ do método para os compostos em estudo**

Éster Graxo	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )
Éster Palmítico	1,0	2,0
Éster Esteárico	1,0	2,0
Éster Oléico	1,0	2,0
Éster Linoléico	1,0	2,0
Éster Linolênico	1,0	2,0
Éster Eicosenóico	1,0	2,5
Éster Heneicosanóico	1,0	2,0
Éster Behênico	1,0	2,5

#### 5.2.4 Precisão

A precisão foi determinada em termos de repetitividade (RSD<sub>r</sub>) e precisão intermediária (RSD<sub>pi</sub>), sendo expressa pelo RSD% da amostras após dez injeções. Os resultados para a precisão do instrumento obtidos através das soluções padrões estão na tabela 10.

A repetitividade (n=10) para o instrumento GC-MS-QP 2010 Plus Shimadzu e a precisão intermediária (n=9) para o método, ambos nos níveis de concentração 2,5; 7,5; 12,5 e 20,0 mg L<sup>-1</sup> da mistura dos ésteres, ficaram entre 0,64 e 6,79% e para o instrumento e entre 0,43 e 9,87% para o método.

Ribani *et al.* (2004) recomenda uma precisão com RSD ≤ 20% para ser aceitável em métodos cromatográficos, portanto os valores de RSD% tanto para o método quanto para o instrumento foram considerados aceitáveis.

**Tabela 10 - Precisão Instrumental (RSD %) – repetitividade (n=10) e precisão intermediária (n=9)**

Ésteres	RSD <sub>r</sub> (%)				RSD <sub>pi</sub> (%)			
	2,5	7,5	12,5	20,0	2,5	7,5	12,5	20,0
Palmítico	5,56	3,02	1,46	2,74	7,40	2,36	1,36	1,53
Linoléico	5,82	4,69	2,33	3,26	5,93	2,10	2,37	2,95
Oléico	4,44	2,37	2,08	2,16	3,84	4,54	1,36	6,15
Linolênico	5,50	3,80	4,12	4,08	7,31	1,48	0,78	4,11
Esteárico	4,90	2,13	1,99	2,74	4,70	1,52	0,69	2,19
Eicosenóico	5,86	3,62	1,37	2,03	9,87	2,84	1,75	1,47
Heneicosenóico	6,79	2,48	1,17	2,01	4,59	1,19	0,55	3,23
Behênico	4,05	1,78	0,64	1,14	5,96	0,56	0,43	0,76

#### 5.2.5. Exatidão

A exatidão foi avaliada a partir dos ensaios de adição de padrão na amostra utilizando-se também padrão interno para os testes. Os resultados para os testes de exatidão do método estão descritos na tabela 11. Os valores foram expressos em termos de desvio padrão relativo (RSD%).

A partir dos resultados obtidos e demonstrados na tabela 11, pode-se perceber que os RSD's (%) foram pequenos, sendo todos menores que 8%. Segundo BROWN e colaboradores (2009) a utilização do padrão interno no método de adição de padrão melhora a precisão e exatidão do método, o que pode ser um dos motivos de baixos RSD's (%).

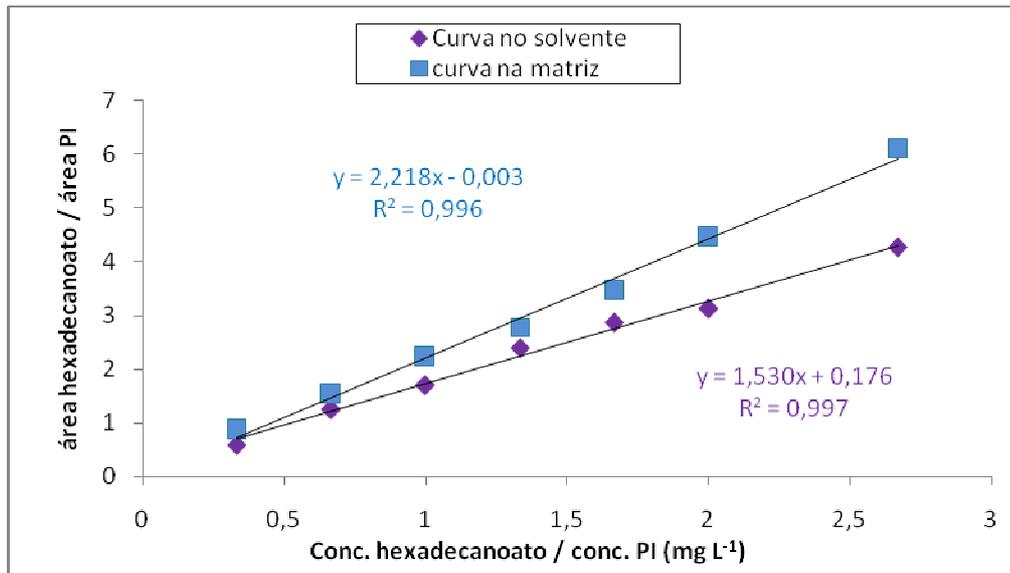
Os valores para Exatidão (%) ficaram entre 89 e 117%. Os valores de exatidão foram satisfatórios uma vez que são aceitos valores entre 70 e 120% (SANCO, 2007). E em alguns casos dependendo da complexidade da amostra e do método empregado, essa faixa de valores pode ser ampliada ou restringida.

**Tabela 11 – Exatidão (%) e RSD (%) do método para os compostos em estudo a partir dos ensaios de adição de padrão**

<b>Composto</b>	<b>Nível de fortificação (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
Hexadecanoato	2,5	117,6	6,28
	7,5	99,7	1,48
	12,5	96,1	1,55
	20,0	102,6	2,47
Linoleato	2,5	92,4	4,66
	7,5	98,6	3,22
	12,5	102,1	7,34
	20,0	105,9	2,19
Linolenato	2,5	89,5	6,20
	7,5	94,3	5,78
	12,5	99,2	3,12
	20,0	104,3	4,67
Octadecanoato	2,5	105,4	3,46
	7,5	102,8	2,22
	12,5	101,2	4,89
	20,0	99,0	5,07
Eicosenoato	2,5	97,4	2,34
	7,5	90,2	4,57
	12,5	93,5	5,87
	20,0	100,3	7,45
Heneicosenoato	2,5	103,4	3,87
	7,5	100,2	6,56
	12,5	98,4	2,67
	20,0	97,0	3,02
Docosanoato	2,5	99,3	4,30
	7,5	108,4	2,44
	12,5	105,6	3,65
	20,0	103,1	1,99

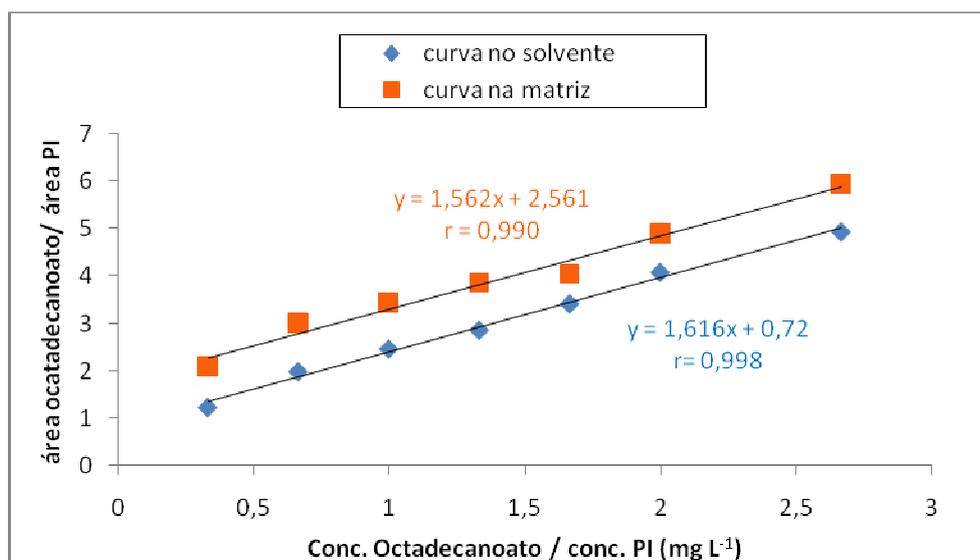
### 5.3 Avaliação do Efeito Matriz

A ocorrência ou não do efeito matriz no biodiesel metílico de tungue foi avaliada através das curvas analíticas dos compostos de interesse. Na Figura 21 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para o hexadecanoato de metila.



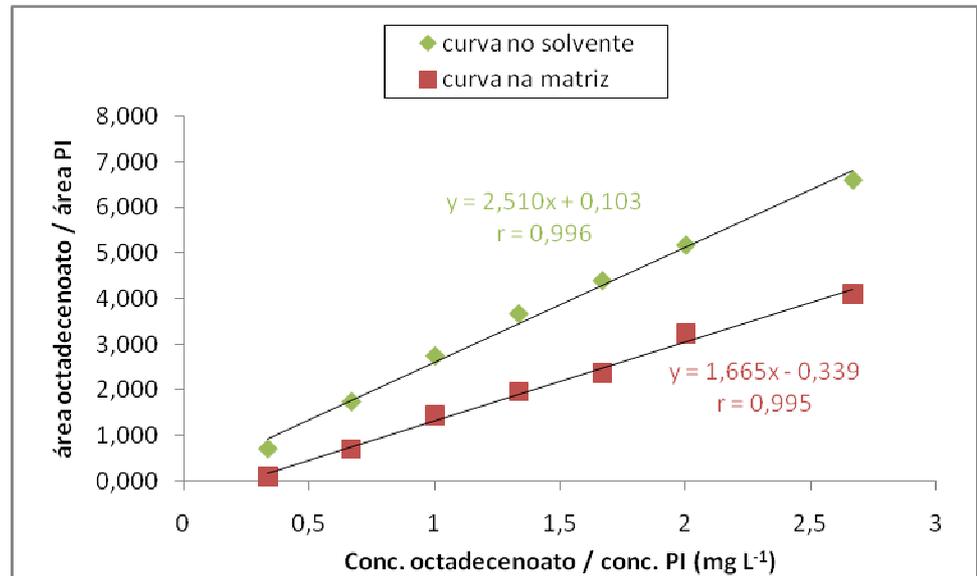
**Figura 21 - Curvas analíticas do hexadecanoato de metila no solvente e na matriz**

Na figura 22 são apresentadas as curvas no solvente e na matriz para o metil octadecanoato.



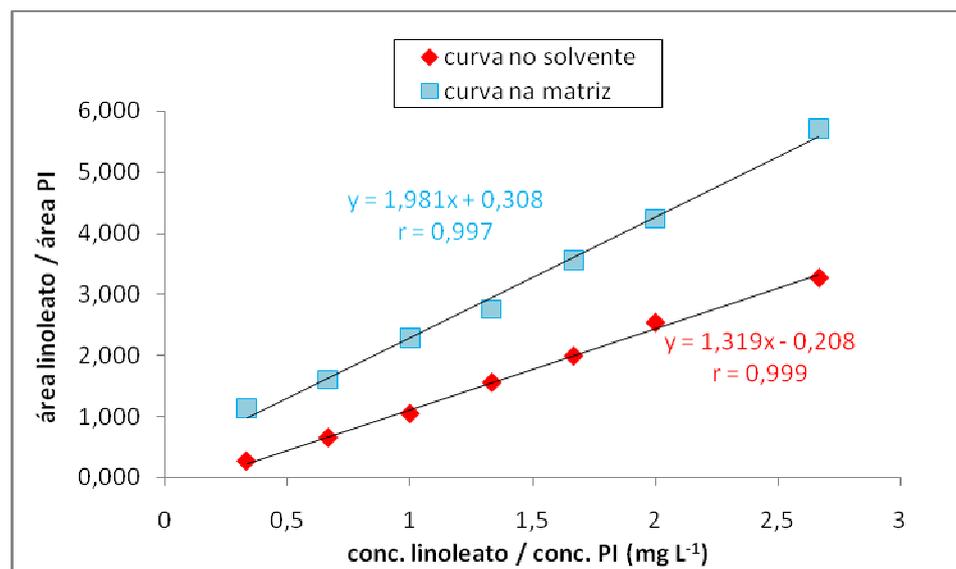
**Figura 22 – Curvas analíticas do octadecanoato de metila no solvente e na matriz**

Na figura 23 são apresentadas as curvas para o octadecenoato de metila no solvente e na matriz.



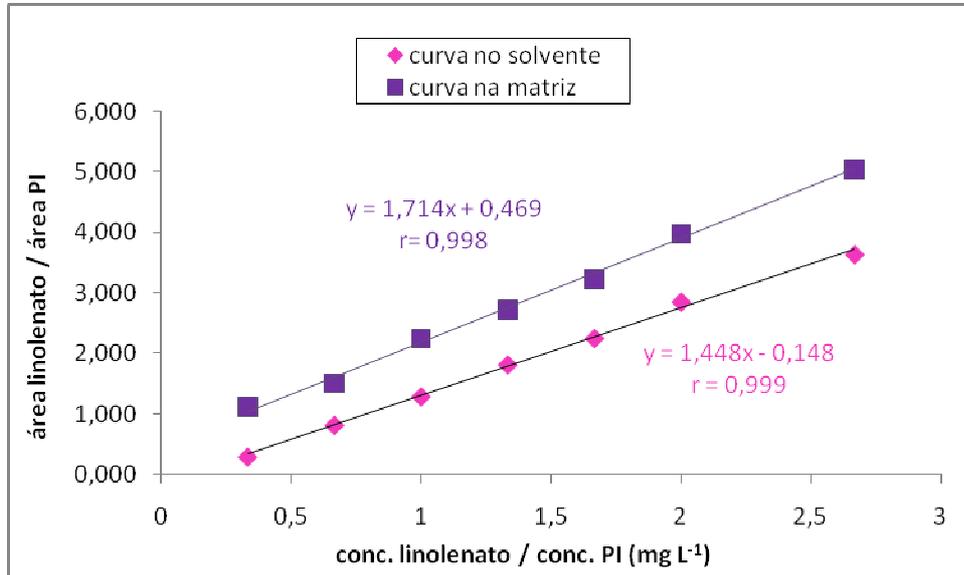
**Figura 23 – Curvas analíticas do octadecenoato de metila no solvente e na matriz**

Na figura 24 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para o linoleato de metila.



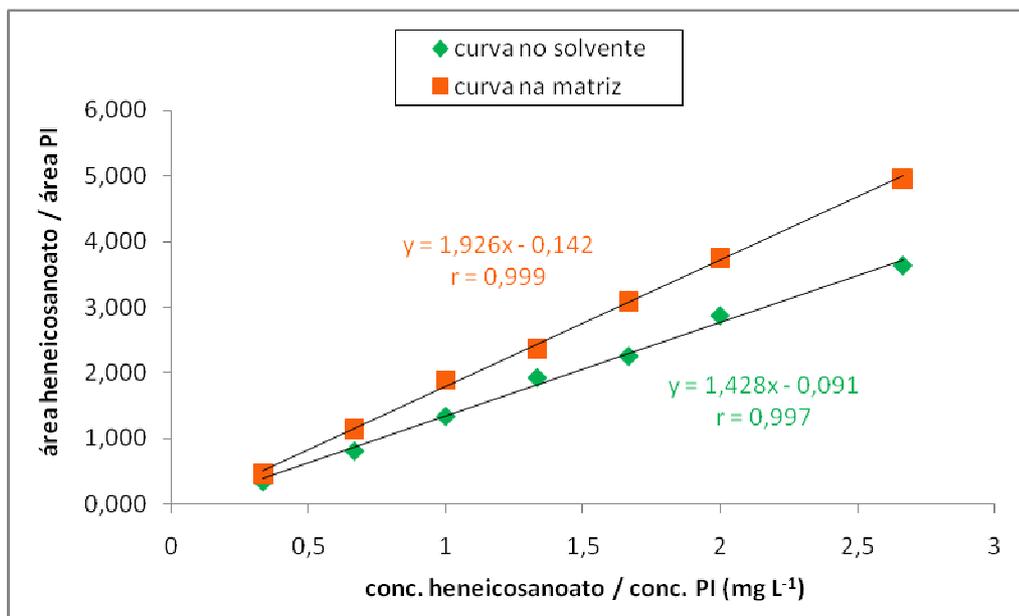
**Figura 24 – Curvas analíticas do linoleato de metila no solvente e na matriz**

Na figura 25 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para o linolenato de metila.



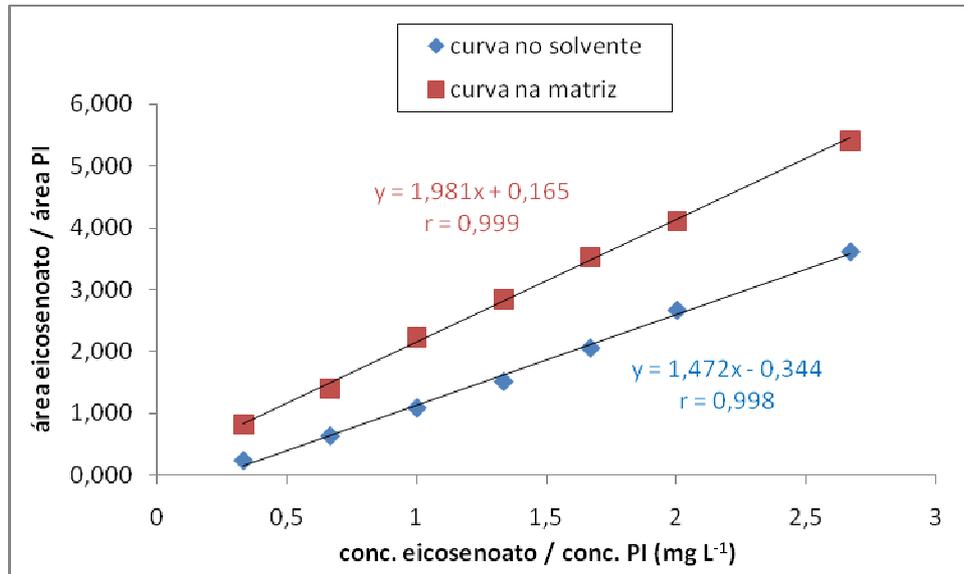
**Figura 25 – Curvas analíticas do linolenato de metila no solvente e na matriz**

Na figura 26 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para o heneicosanoato de metila.



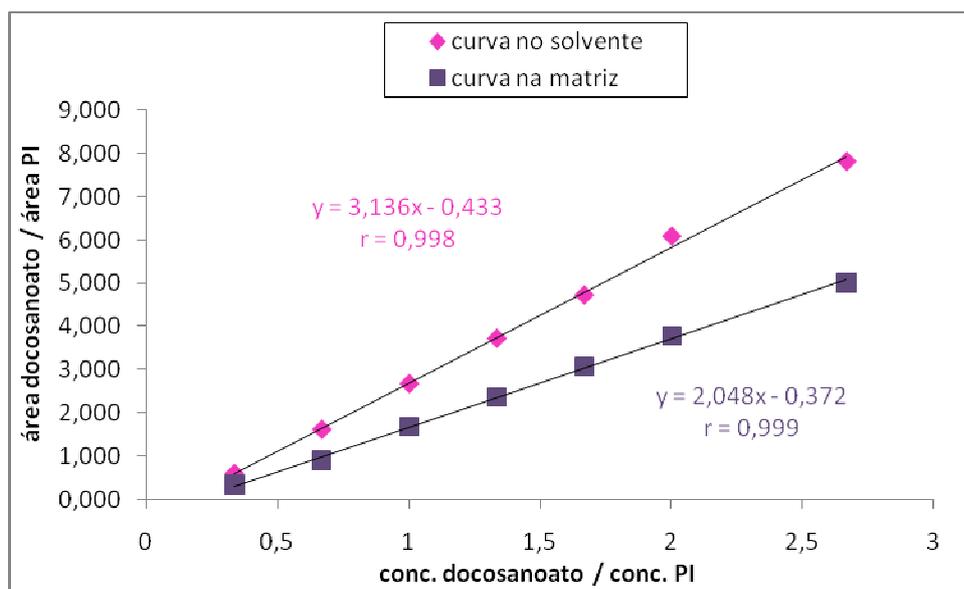
**Figura 26 – Curvas analíticas do heneicosanoato de metila no solvente e na matriz**

Na figura 27 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para o eicosenoato de metila.



**Figura 27 – Curvas analíticas do eicosenoato de metila no solvente e na matriz**

Na figura 28 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para o docosanoato de metila.



**Figura 28 – Curvas analíticas do docosanoato de metila no solvente e na matriz**

A partir dos cálculos descritos no item 4.7.6, pode-se verificar se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. O efeito matriz é considerado baixo para uma faixa de supressão/enriquecimento de sinal de  $\pm 20\%$ , médio para faixas entre  $\pm 20-50\%$  e alto para faixas maiores que  $\pm 50\%$  (ECONOMOU *et al.*, 2009).

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 o docosanoato de metila (behênico). Isso pode ser confirmado através dos resultados apresentados na Tabela 12. Para a maioria dos compostos o efeito matriz foi positivo, ou seja, um enriquecimento do sinal, indicando para os compostos estudados um comportamento semelhante do que se tem descrito na literatura, sobre efeito matriz em análises por GC. Para o octadecanoato e octadecenoato o efeito matriz foi negativo, ou seja, uma supressão do sinal, efeito contrário do esperado para GC.

PINHO e colaboradores (2009) explicam que o enriquecimento de sinal em GC é devido principalmente ao liner, pois quando a solução é preparada em solvente puro, os sítios ativos do insersor estão disponíveis para a retenção dos analitos. Assim, quantidades menores que as reais são transferidas para a coluna e o detector. Já quando a análise é realizada em um extrato fortificado, ocorre a competição entre os componentes da matriz e os analitos pelos sítios ativos, possibilitando que quantidades maiores dos compostos de interesse sejam detectadas.

**Tabela 12 – Efeito Matriz para os compostos calculado a partir das inclinações das curvas analíticas no solvente e na matriz**

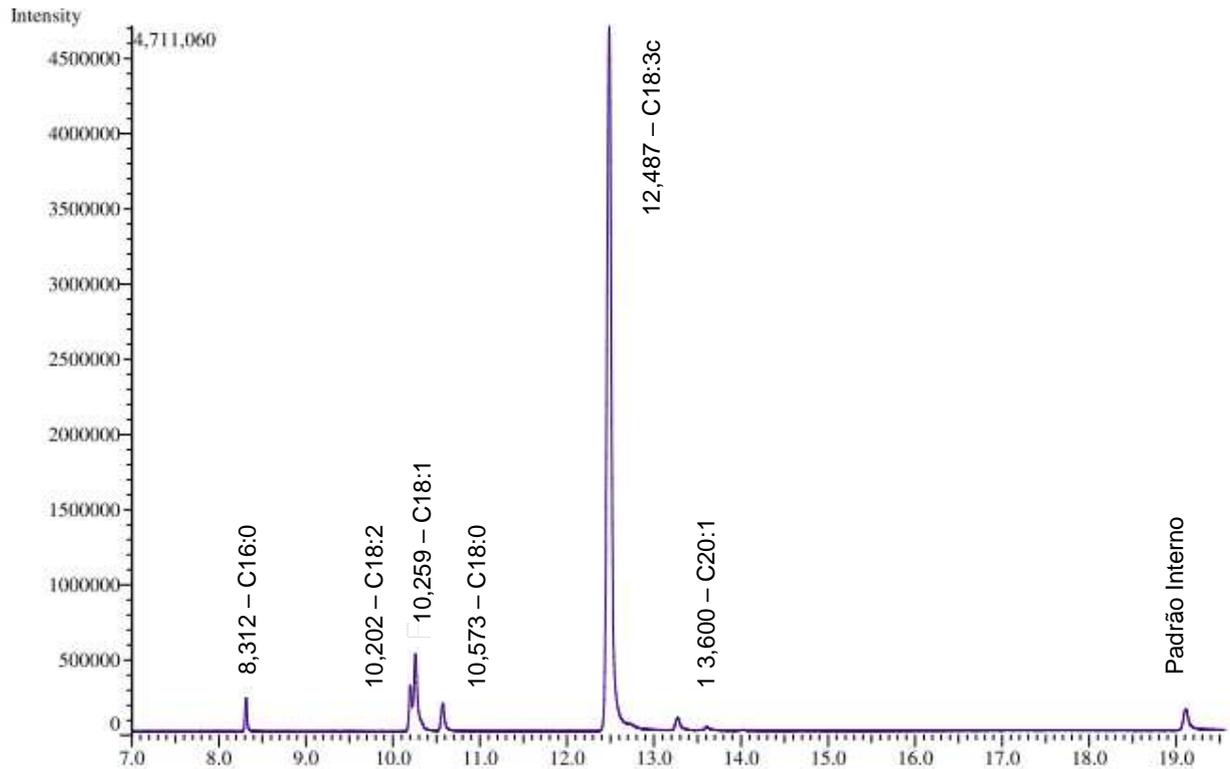
<b>Composto</b>	<b>Efeito Matriz (%)</b>
Hexadecanoato	44,96
Octadecanoato	-3,34
Octadecenoato	-33,6
Linoleato	50,2
Linolenato	18,4
Eicosenoato	34,5
Heneicosanoato	34,9
Docosanoato	53,1

Para o octadecanoato e linolenato, o efeito matriz foi considerado baixo (menor que  $\pm 20\%$ ). Já para o hexadecanoato, octadecenoato, eicosenoato e heneicosanoato o efeito matriz foi considerado médio (entre  $\pm 20$  e  $50\%$ ). E o docosanoato e linoleato apresentaram efeito matriz alto (maior que  $\pm 50\%$ ) (ECONOMOU *et al.*, 2009).

Como os resultados do efeito matriz foram consideráveis, mostrou-se preferível a realização da curva na matriz. Entretanto, em análises de rotina a utilização de curvas na matriz torna-se muito dispendioso e exaustivo, pois 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 amostra de biodiesel de tungue e blendas. Por isso a quantificação através de curvas analíticas no solvente com adição de padrão interno, (que minimiza o efeito de matriz) faz-se necessário nesse caso.

## **6 Aplicação do Método**

O método foi aplicado para o biodiesel metílico de tungue, produzido pelo Laboratório de Química Orgânica da FURG. Na figura 29 um cromatograma com o perfil graxo do biodiesel metílico de tungue pode ser visto.



**Figura 29 – Cromatograma do perfil graxo do biodiesel metílico de tungue (B100), com tempo de retenção e identificação de cada composto**

Os valores, em porcentagem, para cada éster estão descritos na tabela 13.

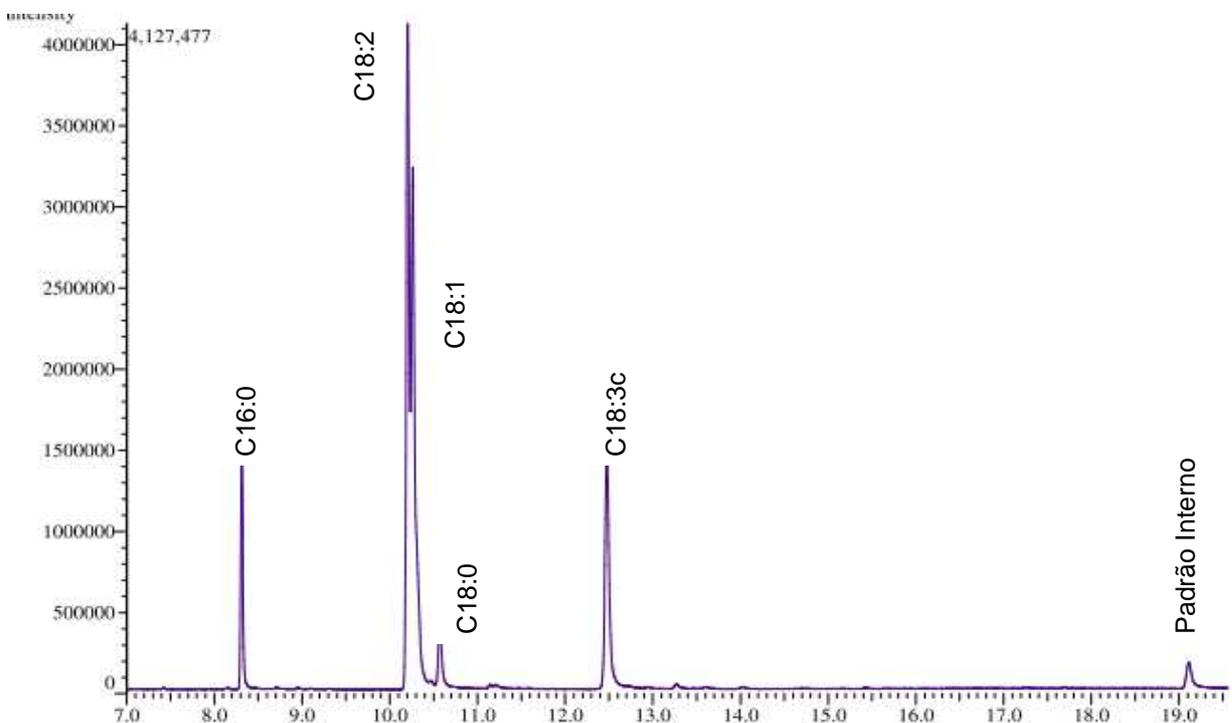
**Tabela 13 – Percentual de ésteres graxos do biodiesel de tungue a partir do método proposto**

Éster Graxo	Estrutura	Conc. (%)	Valores de Referência (%)	
			AOCS	PARK <i>et al.</i> (2008)
Palmítico	C16:0	2,25	2,0	3,3
Estearico	C18:0	2,79	3,0	2,2
Oléico	C18:1	7,92	4,0 – 10,0	8,56
Linoléico	C18:2	3,72	8,0 – 15,0	11,51
Linolênico	C18:3	nd	2,0	--
<b><math>\alpha</math>-eleosteárico</b>	<b>C18:3c</b>	<b>80,50</b>	<b>71,0 – 82,0</b>	<b>63,80</b>
Eicosanóico	C20:1	0,70	--	0,75
Heneicosanóico	C21:0	nd	--	0,46
Behênico	C22:0	nd	--	8,39
não identificados		2,12	--	1,03

Pode-se perceber que os valores obtidos na análise (tabela 13) encontram-se dentro dos valores de referência da AOCS e também dos valores obtidos por PARK *et al.* (2008). Somente o éster linolêico encontrou-se abaixo dos valores de referência.

Os ésteres linolênico, heneicosanóico e behênico não foram detectados. Para o éster heneicosanóico, a “não-deteccção” pode estar ligada à sua baixa porcentagem, podendo estar presente abaixo do limite de detecccção, e assim não sendo detectado pelo método ou mais possivelmente não estar presente na amostra. Para o éster behênico, o valor de referência (%) descrito por PARK *et al.* (2008) é considerável, estando acima de 8%. Já a AOCS não descreve o composto no perfil do óleo de tungue. Os valores controversos podem ser explicados pela diversidade de espécies do gênero *Alleurites* (fatores bióticos) e ainda pelas modificações na porcentagem da composição de óleos decorrentes de fatores abióticos.

A aplicabilidade do método também foi testada para blendas de biodiesel de tungue:soja em três diferentes proporções: 15:85, 20:80 e 25:75 (v/v). As figuras 30, 31 e 32 demonstram os cromatogramas das análises.



**Figura 30 – Cromatograma do perfil graxo da mistura de biodiesel metílico de tungue e soja na proporção 15:85 (v/v)**

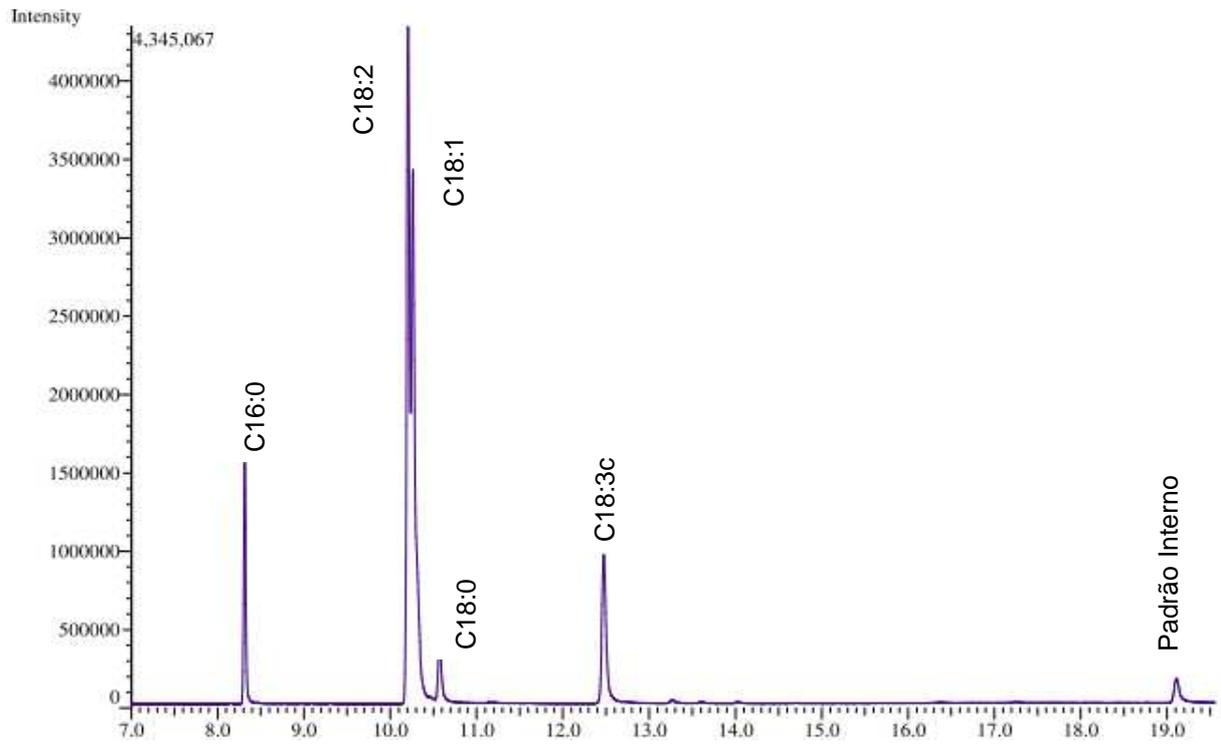


Figura 31 – Cromatograma do perfil graxo da mistura de biodiesel metílico de tungue e soja na proporção 20:80 (v/v)

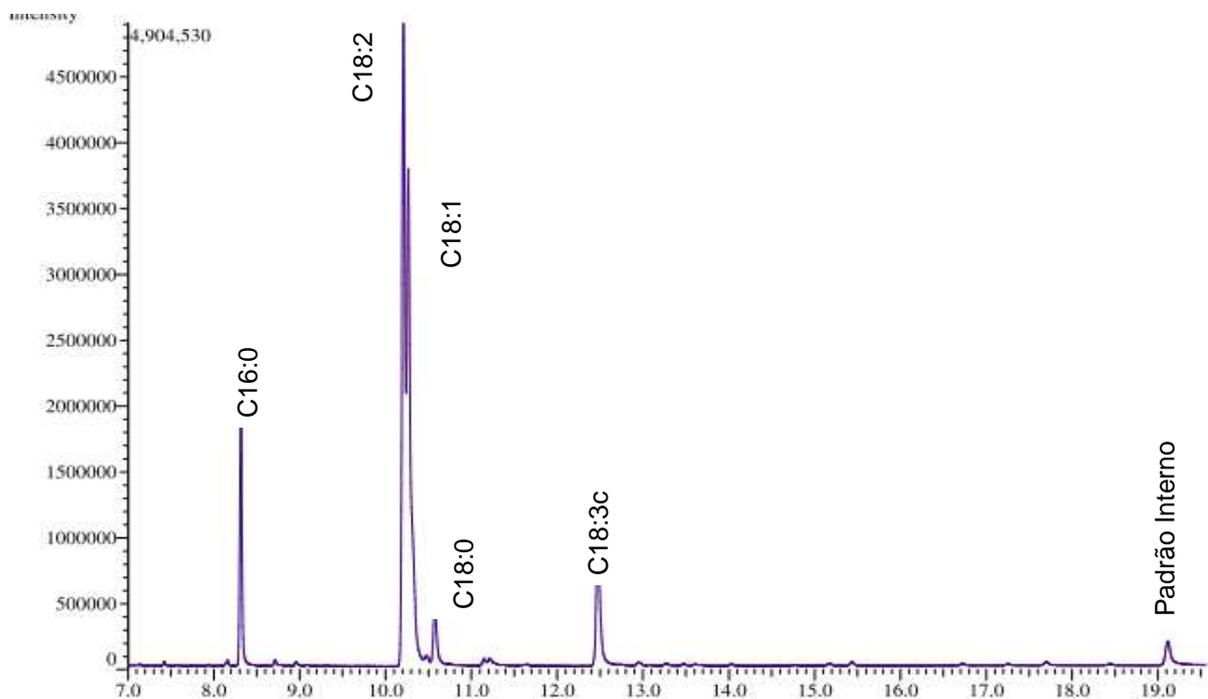
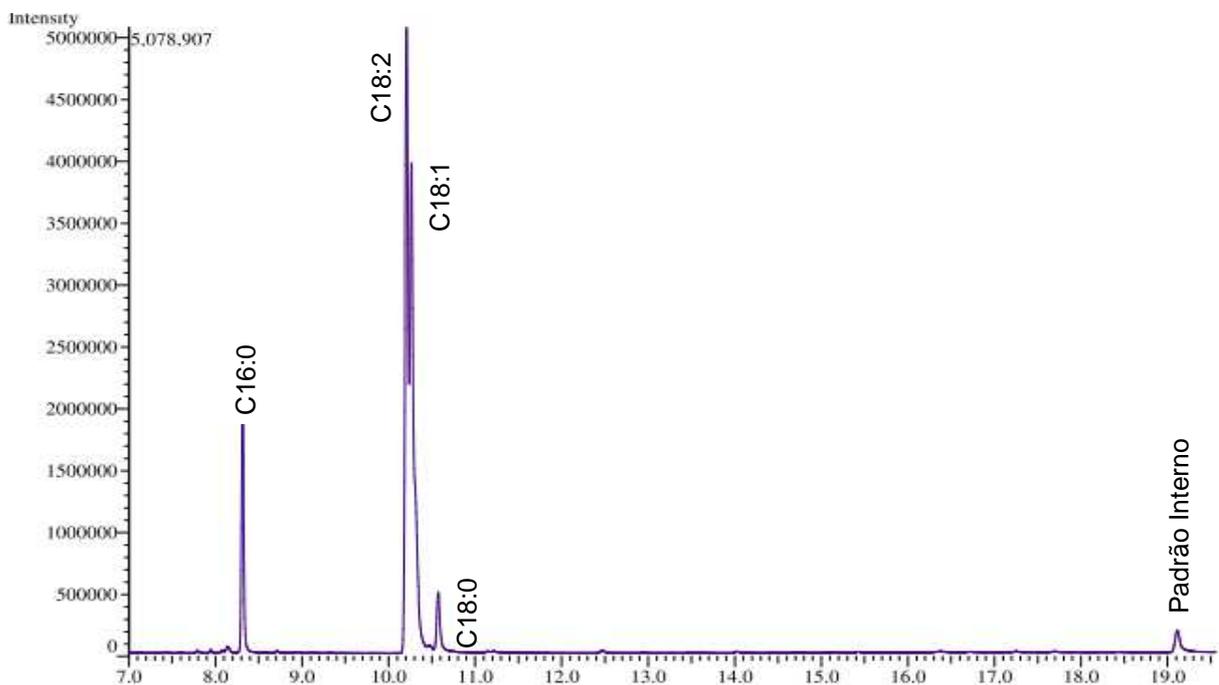


Figura 32 – Cromatograma do perfil graxo da mistura de biodiesel metílico de tungue e soja na proporção 25:75 (v/v)

A aplicabilidade do método pôde ser testada para a soja e misturas com tungue, pois os componentes do biodiesel de soja são os mesmos do biodiesel de tungue, com exceção do  $\alpha$ -eleosteárico. Com isso, o método que a princípio foi desenvolvido para o biodiesel metílico de tungue, ampliou a gama de amostras, demonstrando ser um método robusto.

A figura 33 demonstra o perfil cromatográfico de uma amostra de biodiesel metílico de soja.



**Figura 33 – Cromatograma do perfil graxo do biodiesel metílico de soja (B100)**

A tabela 14 traça um comparativo da composição do perfil cromatográfico das amostras de biodiesel de tungue e blendas com soja, utilizando a curva na matriz.

Primeiramente, é importante ressaltar que as amostras sofrem diferentes processos, pois também estão em processo de otimização e, além disso, outros fatores como: localidade da matéria-prima, lote do óleo, pH do solo, clima entre outros, também podem contribuir para que diferentes resultados possam ser encontrados.

**Tabela 14 – Quadro comparativo do perfil graxo do biodiesel de tungue, soja e blendas tungue:soja em diferentes proporções**

Éster Graxo	Estrutura	Amostras de Biodiesel				Soja
		Tungue	T:S (15:85)	T:S (20:80)	T:S (25:75)	
Palmítico	C16:0	1,92	11,30	9,70	9,19	12,40
Esteárico	C18:0	2,59	3,82	3,82	3,60	4,40
Oléico	C18:1	7,76	28,38	27,30	26,86	33,10
Linoléico	C18:2	3,51	38,16	37,26	34,30	41,72
Linolênico	C18:3	nd	7,20	6,62	6,83	8,03
<b><math>\alpha</math>-eleosteárico</b>	<b>C18:3c</b>	<b>82,75</b>	<b>10,85</b>	<b>14,90</b>	<b>18,76</b>	--
Eicosenóico	C20:1	0,88	--	--	--	--
Heneicosanóico	C21:0	nd	--	--	--	--
Behênico	C22:0	nd	--	--	--	--
Não identif.	--	0,6	0,3	0,4	0,6	0,35

Através da equação 7, pode-se calcular a porcentagem teórica de  $\alpha$ -eleosteárico que deve ser encontrada nas blendas, utilizando os resultados obtidos na análise do biodiesel de tungue B100.

$$\% \text{ teórica: } \frac{\% \text{ encontrada no B100} \times \% \text{ de biodiesel de tungue na blenda}}{100 \text{ mL}} \quad (7)$$

Conforme descrito no item 3.1.5, a partir da análise do perfil graxo do biodiesel é possível inferir os resultados de algumas das análises necessárias para o controle de qualidade do biodiesel. Por exemplo, os valores descritos para o biodiesel de tungue na tabela 14, mostram que o mesmo não passaria nos testes de estabilidade à oxidação e índice de iodo, pois a porcentagem de  $\alpha$ -eleosteárico é alta, e juntamente com os outros ésteres insaturados, a porcentagem chega a quase 95 %, sendo, portanto, um valor muito alto e propício à oxidação.

Por fim, o método proposto mostrou-se linear, sensível, seletivo, exato, preciso e robusto para análise de biodieseis derivados de tungue e soja e blendas em diferentes proporções.

## 7 CONCLUSÕES

As principais contribuições do trabalho desenvolvido consistem no desenvolvimento de um método para análise do perfil graxo do biodiesel de tungue, que é um biodiesel atípico e com perfil graxo exclusivo e na análise de misturas, que é uma proposta promissora para a solução de muitos problemas relacionados ao controle de qualidade do biodiesel. Ademais, o método proposto pretende contribuir para futuras modificações no método EN 14103, ou até mesmo a implantação de um método brasileiro para análise do teor de ésteres.

A otimização das condições cromatográficas foi realizada, permitindo a identificação e quantificação dos compostos em estudo, em um tempo de análise de 20 min. A escolha pelo detector MS foi satisfatória, pois permitiu a comprovação do  $\alpha$ -eleosteárico a partir do espectro obtido.

Na validação dos métodos foram obtidos resultados satisfatórios. As curvas analíticas apresentaram valores de  $r$  maiores que 0,99 para as faixas de concentração necessárias às aplicações. Os valores de limite de detecção e quantificação foram considerados adequados para análise, apesar de não possuir um limite na legislação de biodiesel, permitindo a quantificação de ésteres na concentração mínima (LOQ) de 0,6%.

A seletividade do método foi assegurada através da utilização do detector de massas e dos tempos de retenção de cada composto. Os valores de exatidão do método ficaram entre 86 e 117%, com RSD% menores que 8%.

O efeito matriz também foi avaliado. Para a maioria dos compostos (6 dos 8 compostos) o efeito foi positivo, ocorrendo o enriquecimento do sinal. E para dois compostos houve uma supressão de sinal. Considerando todos os compostos, o efeito matriz foi considerado médio, ficando entre  $\pm 20$  e 50%. Ainda assim é preferível a opção pela quantificação a partir das curvas por solvente, principalmente pela necessidade de uma curva na matriz para cada amostra.

Durante a aplicação do método, o mesmo se mostrou adequado para amostras de biodiesel metílico de tungue e blendas com soja, nas proporções de 15:85, 20:80 e 25:75 (T:S, v/v). A aplicabilidade do método também foi testada para o biodiesel de soja, obtendo resultados satisfatórios, mostrando-se assim, além de tudo, ser um método robusto.

## 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Verificar a aplicabilidade do método para biodieseis oriundos de outras matérias-primas;
- Isolar o ácido  $\alpha$ -eleosteárico para preparo de padrão analítico;
- Monitorar o perfil graxo dos biodieseis de tungue produzidos no laboratório de Química Orgânica;
- Desenvolver um método por LC-MS/MS para comparação ente os métodos.

## **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

ABREU, F. R., et. al. Utilization of metal complexes as catalyst in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols, **Journal of Molecular Catalysis A:Chemical**, v. 209, p. 29-33, 2004.

ALLEN, C.A.W., WATTS, K.C., ACKMAN, R.G., PEGG, M.J. Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition, **Fuel**, v. 78, p.1319-1326, 1999

ANASTOPOULOS, G., LOIS, E., KARONIS, D., KALLIGEROS, S., ZANNIKOS, F. Impact of oxygen and nitrogen compounds on the lubrication properties of low sulfur diesel fuels, **Energy**, v. 30, p. 415-426, 2005

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: 20 mai. 2010.

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: 20 de mai. 2010.

ARACIL, J., *et al.* Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils, **Fuel**, v.86, p. 2596-2602, 2007.

AUGUSTO, F. Cromatografia a Gás: Curso em Diapositivos, **Chemkeys – Liberdade para aprender**, 10p., 2000.

BONDIOLI, P., The preparation of fatty acid esters by means of catalytic reactions, **Topics in Catalysis**, v.27, p.77-82, 2004

BRANDÃO, K.S.R., SILVA, F. C.; NASCIMENTO, U.M.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; MOURA, K. R. M. **Otimização do processo de produção de biodiesel metílico e etílico de soja**. Disponível em: <[www.biodiesel.gov.br/docs/congressso2006/producao/Soja08.pdf](http://www.biodiesel.gov.br/docs/congressso2006/producao/Soja08.pdf)> Acesso em 15 mar 2010

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.html](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.html)>. Acesso em 12 mai 2010.

BRASIL, Lei nº 11.116, de 18 de maio de 2005, dispõe sobre o Registro Especial, na Secretaria da Receita Federal do Ministério da Fazenda, de produtor ou importador de biodiesel e sobre a incidência da contribuição para o PIS/Pasep e da Cofins sobre as receitas decorrentes da venda desse produto; altera as Leis nº 10.451 de 10 de maio de 2002, e 11.097, de 13 de janeiro de

2005 e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 jan 2005(a). Disponível em: <[www.biodiesel.gov.br/docs/Lei11.116\\_18mai2005.PDF](http://www.biodiesel.gov.br/docs/Lei11.116_18mai2005.PDF)> Acesso em 12 fev 2010

BRASIL, Decreto nº 5.457, de 6 de junho de 2005, dá nova redação ao art. 3º do Decreto nº 5.297, de 6 de dezembro de 2004, que reduz as alíquotas da Contribuição para o PIS/Pasep e da Cofins incidentes na produção e a comercialização de biodiesel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 jun 2005(b). Disponível em: <[www.biodiesel.gov.br/docs/Decreto\\_5.457\\_07jun2005.doc](http://www.biodiesel.gov.br/docs/Decreto_5.457_07jun2005.doc)> Acesso em 12 fev 2010

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.

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

CARIOCA, J.O.B., *et.al.* The hard choice for alternative biofuels to diesel in Brazil, **Biotechnology advances**, v. 27, p. 1043-1050, 2009.

CASAGRANDE, J.G.Jr., *et al.* Produtividade do Tungue em plantios comerciais na Serra Gaúcha, **Embrapa Clima Temperado** - Pelotas/RS, 2008.

CAVALCANTI, C.L.Jr., *et. al.* Properties of biodiesel oils formulated using different biomass sources and their blends, **Renewable Energy**, v. 34, p. 857-859, 2009.

CHAVANNE, C. G. **Procédé de transformation d'huiles végétales em vue de leur utilisation comme carburants**. patente BE 422.877, Bélgica 1938.

CIOLA, R. **Fundamentos de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1998. 178 p.

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

DABDOUB, M.J., *et al.* Biodiesel: Visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria, **Química Nova**, v.32, p.776-792, 2009

DEMIRBAS, A. Biodiesel fuel from vegetable oil via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterification and other methods: a survey, **Energy Conversion and Management**, v. 44, p. 2093-2109, 2003.

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

DIAS, A.N. **Determinação simultânea de glicerol livre e total, mono-,di- e**

**triglicerídeos em biodiesel etílico de girassol, mamona e da mistura sebo e soja empregando GC-FID.** 2010. 133 p. Dissertação (Mestrado em Química) – FURG, Rio Grande. RS.

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

DROWN, D.C., *et al.* Screening vegetable oil alcohol esters as fuel lubricity enhancers, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, p. 579-584, 2001.

DUKE J. A. **Handbook of energy crops.** Purdue: Purdue University, EUA, 1983. Disponível em: [www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Aleurites\\_fordii.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Aleurites_fordii.html) Acesso em 18 fev 2010.

DUNN, R.O. Effect of oxidation under accelerated conditions on fuel properties of methyl soyate (biodiesel), **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, p. 915-920. 2002.

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.

EURACHEM Guide. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.** LGC (Teddington) Ltd, 1998. Disponível em: <http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf>. Acesso em: 20 mai 2010.

FERNANDES, F.A.N., *et al.* Production of biodiesel by ultrasound assisted esterification of *Oreochromis niloticus* oil, **Fuel**, v. 89, p. 275-279. 2010.

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

FU, Y.J., *et al.* Determination of fatty acid methyl esters in biodiesel produced from yellow horn oil by LC, **Chromatographia**, v. 67, p. 9-14, 2008.

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

GOLDEMBERG, J., Coelho, S.T., Plínio, M.N., Lucond, O. Ethanol learning curve—the Brazilian experience, **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 301–304. 2004.

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.

GRUSZYNSKI, C., *et al.* Misturas de casca de tungue e casca de arroz carbonizada no enraizamento de *endranthema morifolium* Tzevelev 'golden polaris' sob método de transpiração, **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 9, n. 1, p. 63-70, 2003.

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

HAIŠLOVÁ, J., *et al.* Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v.800, p.283-295, 1998.

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

HILL, K. Fats and oils as oleochemical raw materials, **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, p. 1255–1264, 2000.

HOYDONCKX, H.E., *et al.* Esterification and transesterification of renewable chemicals, **Topics in Catalysis**, v.27, p.83-96, 2004.

HU, J., DU, Z., LI, C., MIN, E. Study on the lubrication properties of biodiesel as fuel lubricity enhancers, **Fuel**, v. 84, p. 1601-1606, 2005.

INMETRO; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, 2003. 35 p.

INMETRO. Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de Metrologia, **Portaria INMETRO nº 029 de 1995**. SENAI - Departamento Nacional. 5. ed. Rio de Janeiro: SENAI, 2007. 72 p.

KAUTZ, J. **Síntese de biodiesel etílico a partir do óleo de tungue (ALLEURITES FORDII)**, 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – FURG, Rio Grande, RS.

KNOTHE, G. Perspectivas históricas de los combustibles diesel basados em aceites vegetales, **Revista A&G**, v. 47, Tomo XII, No. 2, 2001.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters, **Fuel Processing Technology**, v.86, p.1059-1070, 2005.

KNOTHE, G., GERPEN, J. V., KRAHL, J., RAMOS, L. P. **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 340 p. 2006a.

KNOTHE, G. Analyzing Biodiesel: Standards and Other Methods, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, p. 823-833, 2006b.

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

KUCEK, K.T. **Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino**. 2003. 121p. Dissertação (Mestrado em Química) – UFPR, Curitiba, PR

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.

LIMA, P.C.R. **Biodiesel: Um novo combustível para o Brasil**. Consultoria Legislativa, Brasília-DF, 31p. 2005.

MA, F.,HANNA, M.A.H. Biodiesel production: A Review, **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MACEDO, C. C. S.,et al. New heterogeneous metal-oxides based catalyst for vegetables oil trans-esterification, **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 1291-1296, 2006.

MAGALHÃES, F.C. **Blendas sebo/soja para produção de biodiesel: Proposta de um processo batelada homogêneo como alternativa para agricultura familiar**, 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – FURG, Rio Grande. RS.

MENDHAM, J. *et al.* **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462 p.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis- Departamento de Combustíveis Renováveis. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**. ed. nº27, 2010. Disponível em:

<[http://www.mme.gov.br/spg/galerias/arquivos/publicacoes/boletim\\_mensal\\_combustive\\_renovaveis/Boletim\\_DCR\\_nx\\_027\\_-\\_marxo\\_de\\_2010.pdf](http://www.mme.gov.br/spg/galerias/arquivos/publicacoes/boletim_mensal_combustive_renovaveis/Boletim_DCR_nx_027_-_marxo_de_2010.pdf)>. acesso em 18 mai 2010.

MOURA, C.V.R., et al. Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica, **Química Nova**, v. 30, p. 600-603, 2007.

MOURA, C.V.R., et. al. Biodiesel of tucum oil synthesized by methanolic and ethanolic routes, **Fuel**, v. 87, p. 1718-1723, 2008.

MORAES, D.C **Síntese de biodiesel etílico de girassol utilizando transesterificação alcalina seguido da adição on pot de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – FURG, Rio Grande. RS.

MÜHLEN, C.V., LANÇAS, F.M. Cromatografia Unificada, **Química Nova**, v.27, p.747-753, 2004.

NAIK, S.N., MEHER, L.C., SAGAR, D.V. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – A Review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, p. 248-268. 2006.

NARASSIMHARAO, K., LEE, A., WILSON, K. Catalysts in production of biodiesel: A Review, **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 1, p. 19-30. 2007.

PARENTE, E.J.de S. *et al.* **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. Tecbio, Fortaleza, CE. 2003 Disponível em : <<http://www.universiabrasil.net>>. acesso em 05 jan 2010.

PARK, J.Y. et al., Production and characterization of biodiesel from tung oil, **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 148, p. 109-117. 2008.

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

PRESTES, O.D. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método QuEChERS modificado, clean-up dispersivo e GC-MS (NCI-SIM)** 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

PRIMEL, E. G. **Aplicação da Extração em Fase Sólida e técnicas cromatográficas para a determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório.** 2003. 170 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

QIN, W.H., *et al.* Gas chromatographic retention time rule and mass spectrometric fragmentation rule of fatty acids and its application in food, **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v.35, p.998-1003, 2007

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

RAMOS, L.P., *et al.* Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras, **Química Nova**, v. 23, p. 531-537, 2000.

RAMOS, L.P., *et al.* Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil, **Revista Biotecnologia**, v.31, p. 28-37, 2003

RAMOS, L. P., WILHELM, H. M. Current status of biodiesel development in Brazil, **Applied Biochemistry and Biotechnology Part A- Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 123, p. 807-819, 2005.

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

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

ROCHA, D.Q., *et al.* Determinação da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel adicionado ao diesel mineral através do monitoramento seletivo de íons, **Química Nova**, v. 31, p. 1062-1066, 2008.

SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003). **Document nº SANCO/2007/3131. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** 3ª ed., Bruxelas, Bélgica. 31/10/2007.

SCHUCHARDT, U., *et al.* Transesterification of vegetable oils: a Review, **of Brazilian Chemical Society**, v.9, p.199-210, 1998.

SCHUCHARDT, U., *et al.* A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima, **Química Nova**, v. 24, p. 247–251, 2001.

SHANG, Q., *et al.* Properties of tung oil biodiesel and it's blends with 0<sup>#</sup> diesel, **Bioresource Technology**, v.101, p.826-828, 2010

- SHAY, E.G. Diesel fuel from vegetable-oils—status and opportunities, **Biomass Bioenergy**, v. 4, p. 227–242. 1993.
- 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.
- SINGH, D.; SINGH, S.P. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 200-216, 2010.
- SKOOG, D.A. *et al.* **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.
- SKOOG, D.A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006. 999 p.
- SRIVASTAVA, A., PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, p. 111-133, 2000.
- SUAREZ, P.A.Z., *et al.* Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica, **Química Nova**, v. 30, p. 667-676, 2007<sup>a</sup>.
- SUAREZ, P.A.Z., *et al.* History and policy of biodiesel in Brazil, **Energy Policy**, v. 35, p. 5393-5398, 2007<sup>b</sup>.
- SUAREZ, P.A.Z., *et al.* Determination of the content of fatty acid methyl ester (FAME) in biodiesel samples obtained by esterification using <sup>1</sup>H-NRM spectroscopy, **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.46, p.1051-1054, 2008.
- SUAREZ, P.A.Z., *et al.* Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production, **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 449-453, 2009<sup>a</sup>.
- SUAREZ, P.A.Z., *et al.* Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: Desafios tecnológicos para viabilizá-los, **Química Nova**, v. 32, p. 768-775, 2009<sup>b</sup>.
- SVEIN, A.M. The prediction of fatty acid structure from selected ions in electron impact mass spectra of fatty acid methyl esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, p. 550-560, 2004.
- 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.
- TASHTOUSH, G., *et al.* Combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace. **Applied Thermal Engineering**, v.23, p. 285-293, 2003.
- VALENTINI, S. R., SOMMER, W. A., MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v. 11, p. 26-31, 2007.
- VAN GERPEN, J.H., MONYEM, A. The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions, **Biomass and bioenergy**, v.20, p. 317-325, 2001.

VEKÉY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227 – 236, 2001.

VIEGAS, C.V. **Produção e identificação de FAMES a partir dos lipídeos extraídos da microalga *Chlorella pyrenoidosa***, 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – FURG, Rio Grande. RS.

ZROSTLÍKOVA, J., *et al.* Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A** , v. 937, p. 73-86, 2001.

YIZHE, L., *et al.* Determination of 11 fatty acids and fatty acids methyl esters in biodiesel using ultra performance liquid chromatography, **Chinese Journal of chromatography**, v. 26, p. 494-498, 2008.

## 11 PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO

PARDO, V.L. KURZ, M. H. S., CLEMENTIN, R. M., PRIMEL, E. G. **Otimização de metodologia para determinação do perfil graxo do biodiesel de tungue empregando 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.

PARDO, V.L. **Otimização de metodologia para determinação do perfil graxo do biodiesel de tungue empregando 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. Apresentação Oral.

PARDO, V.L., PRIMEL, E. G. **Desenvolvimento e Validação de metodologia para análise de glicerina livre e total, metanol e etanol por GC-FID em biodiesel de tungue** In: X Encontro de Pós Graduação – FURG, 2008.

PARDO, V.L. KURZ, M. H. S., CLEMENTIN, R. M., PRIMEL, E. G. **Otimização dos parâmetros do GC-MS para determinação do perfil graxo do biodiesel de tungue** In: 3º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas – BrMASS. São Paulo, dezembro, 2009.

PARDO, V.L., CLEMENTIN, R. M., PRIMEL, E. G. **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO BIODIESEL DE TUNGUE E BLENDAS COM SOJA A PARTIR DA ANÁLISE DO PERFIL GRAXO** In: Simpósio Estadual de Agroenergia. Pelotas, agosto, 2010.