

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DOS TEORES DE ÉSTER E
METANOL EM BIODIESEL**

FERNANDO FERRARI FRUTUOSO STACHACK

Cuiabá
Mato Grosso – Brasil
2013

FERNANDO FERRARI FRUTUOSO STACHACK

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DOS TEORES DE ÉSTER E
METANOL EM BIODIESEL**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Química, para obtenção do título de
Mestre em Química.**

Cuiabá
Mato Grosso – Brasil
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S775d Stachack, Fernando Ferrari Frutuoso.
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para
determinação simultânea dos teores de éster e metanol em biodiesel /
Fernando Ferrari Frutuoso Stachack. -- 2013
xv, 70 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Ailton José Terezo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto
de Ciências Exatas e da Terra, Programa de Pós-Graduação em Química,
Cuiabá, 2013.
Inclui bibliografia.

1. biodiesel. 2. metanol. 3. éster. 4. haletos de acila. 5. simultânea. I.
Titulo.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

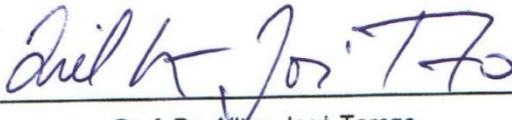
Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

FERNANDO FERRARI FRUTUOSO STACHACK

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DOS TEORES DE ÉSTER E
METANOL EM BIODIESEL

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso,
como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Química, para
obtenção do título de Mestre em
Química.

APROVADA: 19/07/2013



Prof. Dr. Alton José Terezo
(Orientador)



Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan
(Examinador externo)



Profa. Dr. Eliana Freire G. C. Soares
(Examinadora interna)

É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.

Theodore Roosevelt

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me guiar até aqui com saúde e sobriedade.

Ao professor Ailton José Terezo, por sua competência, disponibilidade, compreensão e dedicação como orientador.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, apoio e carinho.

Aos companheiros do laboratório Central Analítica de Combustíveis, Júlio, Tirço, Natália, Paula, Allexandra, Rafael, Orlando e Jéssica que sempre me auxiliaram e muito me ensinaram.

Aos meus colegas de faculdade, que me ensinaram muito nesses dois anos de experiências novas.

Aos professores da Pós-Graduação da química pela dedicação.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Biodiesel.....	3
2.2. Transesterificação.....	4
2.3. Controle de qualidade do biodiesel	7
2.3.1. Glicerina livre e total.....	8
2.3.2. Teor de ésteres e de metanol.....	11
2.4. Derivatização	19
2.5. Formação de ésteres	21
2.6. Validação de métodos.....	23
2.6.1. Seletividade.....	24
2.6.2. Linearidade.....	24
2.6.3. Faixa de trabalho e faixa linear	25
2.6.4. Limite de detecção	25
2.6.5. Limite de quantificação.....	26
2.6.6. Tendência/Recuperação	26
2.6.7. Precisão e Exatidão	27
2.6.8. Robustez	27
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo geral	28
3.2. Objetivos específicos	28

4.	METODOLOGIA.....	29
4.1.	Reagentes, padrões e biodiesel	29
4.2.	Preparo dos padrões	29
4.3.	Condições cromatográficas	30
4.4.	Reação de derivatização e preparo das amostras	32
4.5.	Validação do método.....	33
4.5.1.	Seletividade	33
4.5.2.	Linearidade e faixa de trabalho	34
4.5.3.	Limites de detecção e quantificação.....	34
4.5.4.	Tendência/recuperação	35
4.5.5.	Precisão.....	35
4.5.6.	Robustez	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1.	Estudo da reação de derivatização	37
5.2.	Estudo de interferência da derivatização no teor de éster.....	45
5.3.	Validação da metodologia analítica para determinação do metanol	48
5.3.1.	Seletividade	48
5.3.2.	Linearidade e faixa de trabalho	49
5.3.3.	Limite de detecção e quantificação	51
5.3.4.	Tendência/recuperação	52
5.3.5.	Precisão.....	54
5.3.6.	Robustez	56
6.	CONCLUSÕES	58
7.	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS.....	67

RESUMO

STACHACK, Fernando Ferrari Frutuoso, M.S., Universidade Federal de Mato Grosso. Julho, 2013. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação simultânea dos teores de éster e metanol em biodiesel.** Orientador: Ailton José Terezo.

O presente trabalho teve o objetivo de desenvolver e validar um método analítico para a determinação simultânea dos teores de éster e metanol em biodiesel de óleo de soja a partir da reação de derivatização do metanol com cloretos de acila para formação de um éster metílico. O método foi otimizado para utilização direta na norma EN 14103:2003, da determinação do teor de éster em biodiesel. Foram testadas as reações com cloreto de heptanoíla, octanoíla, nonanoíla, e decanoíla. O tempo total da reação de derivatização otimizada foi de 21 minutos e ocorreu com excesso de cloreto de nonanoíla, presença de piridina como catalisador e álcool propílico para consumir o excesso do cloreto de acila. Para a quantificação do teor de éster, o padrão interno de heptadecanoato de metila foi solubilizado em diclorometano. A identificação e quantificação dos teores de éster e metanol em biodiesel foi realizada por cromatografia gasosa (CG) utilizando coluna de fase polar de polietilenoglicol 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm e detector por ionização em chama (DIC), conforme descrito na norma EN 14103. O pico do nonanoato de metila resultante da derivatização do metanol apresentou excelente resolução. A cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM) foi utilizada para avaliar os produtos da reação de derivatização e a seletividade do método proposto. O coeficiente de correlação obtido para avaliação da linearidade foi superior a 0,999. Os limites de detecção e adotados foram referentes ao menor nível de concentração na curva analítica. A recuperação em amostras com concentração de metanol de 0,0198; 0,2053 e 0,4458 % (m/m), manteve-se

entre 78 e 111 % e o desvio padrão relativo foi menor que 4 %. Os resultados obtidos mostram que o método proposto pode ser empregado para a determinação simultânea dos teores de éster e metanol, facilitando e reduzindo significativamente o custo das análises cromatográficas de controle de qualidade do biodiesel de óleo de soja.

ABSTRACT

STACHACK, Fernando Ferrari Frutuoso, M.S., Universidade Federal de Mato Grosso. July, 2013. **Development and validation of analytical methodology for simultaneous determination of the contents of esters and methanol in biodiesel.** Adviser: Ailton José Terezo.

This work aimed to develop and validate an analytical method for the simultaneous determination of contents of ester and methanol in soybean methyl biodiesel, based in the derivatization of the methanol with acyl chlorides to form methyl esters. The method was optimized for direct use in EN14103:2003 determination of ester content. We tested the reactions with heptanoyl, octanoyl, nonanoyl and decanoyl chlorides. The derivatization reaction was optimized with total time of 21 minutes, excess of nonanoyl chloride, pyridine as catalyst and 2-propanol in order to react with the excess of the acyl chlorides. To quantify the amount of ester was used methyl heptadecanoate solubilized in dichloromethane as internal standard. The identification and quantification of ester and methanol contents in biodiesel was performed by gas chromatography (GC) using polar phase column of polyethyleneglycol of 30 m x 0.25 mm id x 0.25 μ m and flame ionization detector (FID). The peak of methyl nonanoate derivatized showed excellent resolution and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to assess the selectivity of the proposed method. The correlation coefficient obtained for evaluation of linearity was greater than 0.999. The limits of detection and quantification adopted were 0.010% (w/w). Recovery in samples with methanol concentration of 0.0198, 0.2053 and 0.4458% (w/w) was between 78 and 111% and the relative standard deviation was less than 4%. The results show that the proposed method can be used for simultaneous determination of ester and methanol, contents in biodiesel

facilitating and reducing significantly the cost of chromatographic analysis for quality control of soybean biodiesel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reação de transesterificação de triglicerídeos.....	6
Figura 2	(a) Cromatograma de uma amostra de biodiesel derivatizada com MSTFA utilizando 1,2,4 butanotriol e tricaprina como padrões internos. (b) Diferentes constituintes dos mono, di e tri-glicerídeos	10
Figura 3	Cromatograma de biodiesel metílico de óleo de soja: presença de oleato de etila (acima) e ausência de oleato de etila (abaixo); (a) palmitato de metila, (b) estereato de metila, (c) oleato de metila, (d) oleato de etila, (e) linoleato de metila, (f) linolenato de metila	12
Figura 4	Cromatogramas obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho utilizando as seguintes configurações: (A) uma coluna HR0,5; (B) uma coluna HR2 ligada em série a uma coluna HR0,5; (C) duas colunas HR2 ligadas a uma coluna HR0,5. TG: triglicerídeos; DG: diglicerídeos; MG: monoglicerídeos; ME: mistura de ésteres; GLI: glicerina; MT: metanol	14
Figura 5	Espectros de infravermelho próximo na região de 7300-4300 cm^{-1} de (1) óleo de soja puro; (2) biodiesel; (3) mistura de biodiesel metanol; (4) mistura de biodiesel e glicerina livre; (5) mistura de biodiesel e óleo de soja	15
Figura 6	Curvas analíticas para quantificação de metanol em biodiesel em diferentes faixas: (A) curva de segunda ordem para concentrações até 0,06 % (m/m); (B) curva de terceira ordem para concentrações entre 0,06 e 2,00 % (m/m)	17

Figura 7	Cromatograma de biodiesel de soja; 1 – Trimetilmetoxisilano; 2 – Trimetiletoxissilano; 3 – N,N-dimetilformamida; 4 – 1,4-Bis-(trimetilsiloxi)-butano; 5 – 1,2,3-Tris-(trimetilsililoxi)-propano; 6 – Palmitato de metila; 7 – Oleato, linoleato e linolenato de metila	18
Figura 8	Produto da derivatização. a) material sólido branco formado. b) material sólido dissolvido em heptano (esquerda) e material sólido dissolvido em diclorometano (direita)	38
Figura 9	Cromatograma obtido por CG-DIC de uma análise de quantificação do teor de ésteres em amostras de biodiesel de soja utilizando a norma EN 14103. 1 – C16:0 palmitato de metila; 2 – C17:0 heptadecanoato de metila; 3 – C18:0 estearato de metila; 4 – C18:1 oleato de metila; 5 – C18:2 linoleato de metila; 6 – 18:3 linolenato de metila	40
Figura 10	Cromatograma obtido para amostra de biodiesel contendo metanol derivatizado com cloreto de nonanoíla na presença de 2-propanol e piridina. Detalhe refere-se ao tempo total da corrida cromatográfica. 7 – piridina; 8 – 2-metil-octanoato de metila; 9 C9:0 – nonanoato de metila; 10 – nonanoato de propila; 11 – 14-metil-pentanoato de metila	41
Figura 11	Cromatograma obtido do material derivatizado na ausência de biodiesel 7 – piridina; 8 – 2-metil-octanoato de metila; 9 C9:0 – nonanoato de metila; 10 – nonanoato de propila; 11 – 14-metil-pentanoato de metila	41
Figura 12	Cromatograma obtido na injeção da piridina	42
Figura 13	Comparação entre os espectros de massas da piridina e da referência para identificação da piridina	42

Figura 14	Comparação entre os espectros de massas obtidos do pico 8 ($t_R = 3,00$ min) e de referência do 2-metil octanoato de metila	43
Figura 15	Comparação entre os espectros de massas obtidos do para o pico 9 ($t_R = 3,68$ min) e de referência do nonanoato de metila	44
Figura 16	Comparação entre os espectros de massas obtidos do pico 10 ($t_R = 4,00$ min) e de referência do nonanoato de propila	44
Figura 17	Comparação entre os espectros de massas do pico 11 ($t_R = 11,83$ min) e de referência do 14-metil-pentadecanoato de metila	45
Figura 18	Cromatograma da separação de metanol e etanol do método desenvolvido	49
Figura 19	Curva analítica para quantificação do teor de metanol em biodiesel segundo a norma EN 14110	50
Figura 20	Curva analítica para quantificação do teor de metanol em biodiesel pelo método de derivatização proposto	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição dos ácidos graxos de diferentes óleos vegetais % (m/m)	5
Tabela 2	Condições cromatográficas segundo a norma EN 14110	31
Tabela 3	Condições cromatográficas para a metodologia desenvolvida	32
Tabela 4	Modelo aplicado para determinação da robustez do método	36
Tabela 5	Resultados encontrados na determinação do teor de ésteres	47
Tabela 6	Concentração dos padrões de metanol em biodiesel e áreas de resposta do detector de ionização em chama determinadas usando a norma EN 14110 e a metodologia desenvolvida	50
Tabela 7	Resultados obtidos para a determinação do limite de detecção da metodologia desenvolvida	52
Tabela 8	Resultados e comparação para recuperação da metodologia desenvolvida e da norma EN 14110	53
Tabela 9	Resultados obtidos na determinação da precisão do método desenvolvido	55
Tabela 10	Resultados obtidos para robustez em cinco experimentos distintos	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	American Society for Testing and Materials
BSA	N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida
BSTFA	Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CEN	Comité Européen de Normalisation
CG-DIC	Cromatografia gasosa com detecção de ionização em chama (Gas chromatography with flame ionization detector)
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRC	Material de referência certificado
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
PCA	Principal components analysis (Análise dos componentes principais)
PCR	Principal components regression (Regressão por componentes principais)
PLS	Partial least-squares (Regressão por mínimos quadrados parciais)
RMN	Ressonância magnética nuclear

1. INTRODUÇÃO

Grande parte de toda a energia consumida no mundo é proveniente do petróleo, do carvão e do gás natural, porém estas fontes já apresentam uma previsão de esgotamento futuro, tornando a procura por fontes alternativas de energia uma realidade cada vez mais relevante. Nesse sentido, o biodiesel tem sido estudado e empregado como um substituto parcial ou total ao óleo diesel de origem fóssil, haja vista que este biocombustível é perfeitamente miscível e físico-quimicamente semelhante ao óleo diesel mineral, podendo ser usado em motores do ciclo diesel sem a necessidade de significantes ou onerosas adaptações.

Para utilização, um combustível deve apresentar propriedades específicas de acordo com a sua aplicação e pequenas alterações destas características podem ocasionar prejuízos econômicos e danos ao meio ambiente. Assim, o controle de qualidade do biodiesel produzido é de fundamental importância. No Brasil, as especificações do biodiesel são definidas de acordo com a Resolução nº 14 de 2012 da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), que prevê a certificação de qualidade a partir da análise de 23 características físico-químicas. Dentre essas características, destacam-se a determinação do teor de metanol, do teor de ésteres e dos teores de glicerina livre, mono-, di, e tri-glicerídeos, que empregam métodos de cromatografia gasosa. Esse conjunto de análises cromatográficas apresenta o maior custo no controle de qualidade, pois as condições cromatográficas para as determinações destes componentes são bastante diferentes entre si e a realização dos ensaios em um único equipamento envolve a necessidade de trocas constantes de colunas cromatográficas e acessórios, o que se torna inviável em laboratórios de rotina. Assim, no caso das determinações dos teores de metanol e ésteres, são necessários pelo menos dois sistemas de cromatografia dedicados tendo em vista a confiabilidade dos resultados e a

produtividade. Embora ambas as determinações sejam realizadas com detecção por ionização em chama, os métodos cromatográficos são completamente incompatíveis. A determinação do éster envolve amostragem líquida, enquanto que a do metanol é realizada em fase gasosa (*headspace*). A primeira utiliza coluna cromatográfica polar (polietilenoglicol), a segunda utiliza uma coluna apolar (polidimetilpolisiloxano).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método de determinação simultânea dos teores de ésteres e de metanol no biodiesel metílico de soja. O método baseia-se na derivatização do metanol para formação de ésteres compatíveis com os presentes no biodiesel e assim, empregar as mesmas condições cromatográficas especificadas para análise teor de ésteres com base na norma EN 14103.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biodiesel

O biodiesel é um combustível natural utilizado em motores diesel, produzido através de fontes renováveis com objetivos sociais e ambientais, associado à fixação do homem nas áreas rurais e sua produção envolve vários setores como o plantio, a produção, o transporte e a distribuição nos postos. Além disso, sua produção está diretamente ligada à preocupação com a emissão de gases poluentes (NETO, 2005).

Alguns autores definem o biodiesel como um combustível ecológico, de fontes renováveis, obtidos através da transesterificação de triglicerídeos, pela mistura de óleos vegetais ou gorduras animais com alcoóis de cadeia curta, comumente metanol ou etanol e um catalisador, e nesse processo há formação da glicerina como subproduto (FERRARI, 2005). A definição de biodiesel, segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), é um combustível composto de monoalquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais (ANP, 2012).

Dentre as vantagens do biodiesel frente ao óleo diesel destaca-se o fato de o biodiesel ser derivado de recursos renováveis, disponíveis homoganeamente no globo; emitir menos gases de efeito estufa, devido ao seqüestro de carbono ocorrido no crescimento da biomassa; ser biodegradável e não tóxico; possuir excelente lubricidade (TAT, 1999); ser virtualmente livre de enxofre e aromáticos e possuir alto número de cetano. Além disso, possui nicho de mercado específico, diretamente associado a atividades agrícolas, entre outros (COSTA NETO, 2000). Entre as desvantagens do biodiesel frente ao óleo diesel, cita-se a maior absorção

de água durante a estocagem; a ocorrência de componentes insaturados susceptíveis de oxidação (KNOTHE, 2006); o fato de possuir 12% menos energia que o mesmo volume do combustível de origem fóssil e de poder causar maior formação de depósitos de carbono e formação de borra, levando ao entupimento de bicos e filtros (ATABANI, 2012).

Como foi descrito por Knothe, o primeiro relato do que é conhecido por biodiesel foi patenteado na Bélgica em 1937 tendo sido descrita a utilização de ésteres etílicos de óleo de palma como combustível em motores diesel. Naquela época, a transesterificação foi obtida por catálise ácida sendo que hoje praticamente toda produção utiliza-se da catálise básica (CHAVANNE, 1938, apud, KNOTHE et al., 2006).

2.2. Transesterificação

A transesterificação é uma reação orgânica clássica empregada em inúmeros laboratórios e possui diversas aplicações industriais como a aplicação em polimerizações, utilização em indústrias de tintas e em algumas reações para produção de poliéster. Em alguns casos, a transesterificação é mais vantajosa que a síntese de ésteres a partir de ácidos carboxílicos e álcool (OTERA, 1993). A produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras é possível porque eles são compostos principalmente de triglicerídeos. Os triglicerídeos consistem em estruturas de glicerinas que contêm ácidos graxos ligados nas posições das hidroxilas. Na Tabela 1, apresenta-se a composição de ácidos graxos em diferentes óleos vegetais. A presença destes diferentes perfis influencia na produção e nas propriedades físico-químicas do biodiesel, uma vez que, a natureza e a composição dos triacilgliceróis sofrem a influência direta da fonte da qual são originados. O tipo e a concentração do ácido graxo apresentam efeitos importantes na sua conservação e também na oxidação do biodiesel (CANAKCI, 2003).

Tabela 1 - Composição dos ácidos graxos de diferentes óleos vegetais % (m/m).

Ácido graxo	Matéria-prima						
	Palma	Coco	Soja	Amendoim	Algodão	Milho	Girassol
Capróico C6:0	0,2	0,5	-	-	-	-	-
Caprílico C8:0	3,3	8,0	-	-	-	-	-
Cáprico C10:0	3,5	6,4	-	-	-	-	-
Láurico C12:0	47,8	48,5	-	-	Traços	-	-
Mirístico C14:0	16,3	17,6	0,1	0,1	0,8	-	-
Palmítico C16:0	8,5	8,4	11,0	11,6	23,7	12,2	6,5
Esteárico C18:0	2,4	2,5	4,0	3,1	2,6	2,2	4,5
Oléico C18:1	15,4	6,5	23,4	48,5	18,4	27,5	21,1
Linoléico C18:2	2,4	1,5	53,2	31,4	53,0	57,0	66,2
Linolênico C18:3	-	-	7,8	-	0,1	0,9	-
Araquídico C20:0	0,1	-	-	1,5	0,3	0,1	0,3
Saturados	82,1	91,9	15,1	16,3	27,4	14,5	11,3
Monoinsaturados	15,4	6,5	23,4	48,5	18,4	27,5	21,1
Polinsaturados	2,4	1,5	61,0	31,4	31,1	57,9	66,2

Fonte: CANAKCI, 2003

A transesterificação, também chamada alcoólise, consiste na substituição da carboxila de uma molécula de triacilglicerol por uma hidroxila de um álcool sendo uma reação similar à hidrólise, na qual o álcool é utilizado ao invés da água (Figura 1). Os alcoóis convenientes para essa

catalisadores são o hidróxido de sódio e o hidróxido de potássio que formam alcóxidos na presença de álcool (KNOTHE, 2006). Independente da rota (ácida ou básica), o processo envolve etapas de reação, separação e purificação que determinam a qualidade do produto final.

2.3. Controle de qualidade do biodiesel

A qualidade do biodiesel tem sido alvo de pesquisas em nível mundial para manter as características do produto final. Os cuidados vão desde ao armazenamento da matéria-prima até a distribuição na bomba, a fim de garantir ao consumidor um combustível dentro das especificações técnicas. Além disso, o controle de qualidade tem papel fundamental no que diz respeito à verificação das etapas de produção, pois substâncias que causam danos ao motor e ao meio ambiente não devem constituir o biodiesel.

No Brasil, a Portaria N. 225 emitida pela ANP em 2003 foi o primeiro documento de regulação desenvolvido a fim de estabelecer normas e especificações para a comercialização do biodiesel, visando proteger consumidores e o meio ambiente. Nesta portaria, algumas características físico-químicas importantes como a massa específica e a viscosidade não possuíam limites estabelecidos. Quanto às características químicas, o teor de éster ainda não era um item presente na tabela de especificações e os limites do teor de glicerina total e de água possuíam valores maiores do que os permitidos pela legislação atual. Dessa forma, o biodiesel produzido estaria mais propenso a problemas como formação de borra e entupimento de bicos injetores durante a queima (ANP, 2003).

Em 2004, a Portaria N. 225 foi revogada e substituída pela Resolução ANP N.42, de 2004 e dentre as mudanças da especificação do biodiesel encontram-se a diminuição do limite estabelecido para o resíduo

de carbono. Os valores dos teores de éster, mono-, di- e triglicerídeos passam a ser monitorados, mas sem limites definidos (ANP, 2004). A Resolução N. 42 de 2004 foi revogada e substituída pela Resolução Nº 7 de 2008 que trouxe várias mudanças na especificação do biodiesel a fim de melhorar a qualidade do combustível produzido e utilizado no país. Dentre as características que passaram a apresentar limites definidos estão a massa específica, a viscosidade cinemática, o ponto de entupimento a frio, a contaminação total, o teor de éster e a concentração de cálcio, magnésio e fósforo. Além destas mudanças, os teores de glicerina total e de metanol tiveram seus limites máximos diminuídos (ANP, 2008).

Em 2012, a Resolução N.14 de 2012 entrou em vigor revogando e substituindo a Resolução N.7 de 2008. A diminuição dos limites máximos dos teores de água e enxofre total são dois itens importantes desta resolução. Além disso, os teores de mono-, di- e tri-glicerídeos voltam a apresentar limites máximos estabelecidos (ANP, 2012).

2.3.1. Glicerina livre e total

A glicerina é o principal co-produto da produção do biodiesel e sua determinação está relacionada com a eficácia do processo de separação e purificação do biodiesel. Em excesso, a glicerina causa problemas de armazenamento e a queima desta ocasiona danos ao motor, como entupimento de bicos e formação de resíduos além da formação de aldeídos (MONTEIRO et al., 2008; LÔBO et al., 2009). Durante a produção do biodiesel, a maior parte da glicerina livre e total é facilmente removida na etapa de lavagem, porém teores menores podem restar e sua remoção é dificultada, porém possível em etapas empregando-se catalisadores específicos ou separação por destilação (PLANK, 1995; MITTELBAACH, 1996a).

Vários trabalhos foram desenvolvidos a fim de otimizar a quantificação destes compostos no biodiesel sempre visando métodos mais rápidos,eficientes e de menor custo (FREEDMAN et al., 1984; FREEDMAN et al. 1986; TRATHNGG, 1990; MITTELBAACH, 1993; PLANK et al., 1995). Em um destes trabalhos, Planck et al. (1995) desenvolveram um método no qual a glicerina livre e os mono, di e tri-glicerídeos foram analisados simultaneamente por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-DIC) com a derivatização destas substâncias utilizando BSTFA (Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) e MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida). Os autores relatam que o primeiro agente derivatizante necessitou de maior tempo de reação e aquecimento, já o segundo forneceu reação com altas taxas de conversão em menor tempo e à temperatura ambiente. Na Figura 2, apresenta-se o cromatograma (a) com detalhamento das regiões de mono-, di- e triglicerídeos (b). Analisado o cromatograma, verifica-se que o método analítico utilizado foi eficaz e capaz de separar os diferentes constituintes da amostra, de acordo com o número de carbonos de cada cadeia. Outro fato importante foi o número de substâncias separadas em um tempo relativamente curto (30 minutos) utilizando uma metodologia simples.

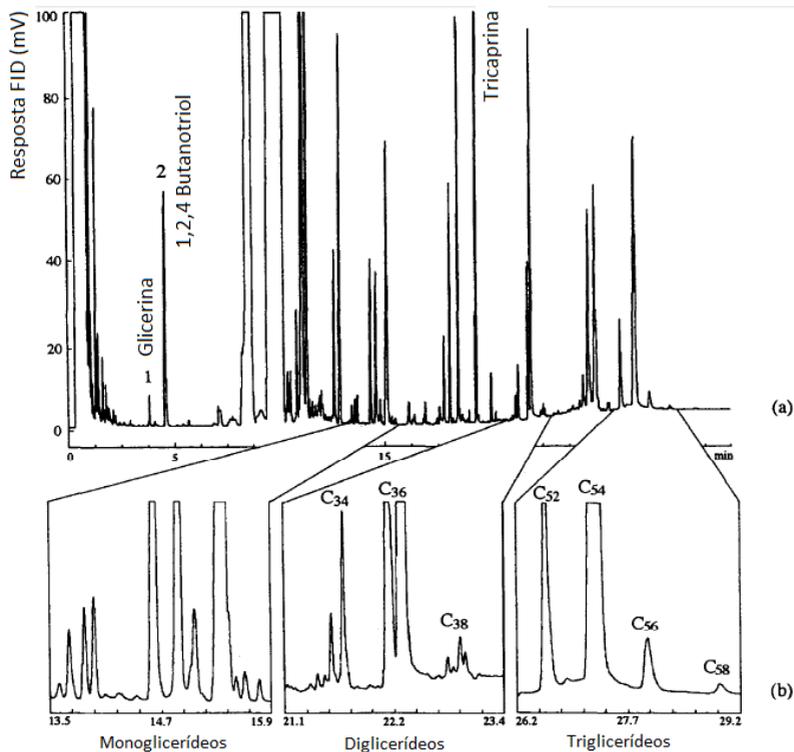


Figura 2 - (a) Cromatograma de uma amostra de biodiesel metílico de soja derivatizada com MSTFA utilizando 1,2,4 butanotriol e tricaprina como padrões internos. (b) Diferentes constituintes dos mono, di e tri-glicéridos. Extraído de PLANK, 1995.

Este resultado serviu como base para os métodos oficiais dessa análise que são a norma ASTM D 6584 e EN/ISO 14105, que utilizam MSTFA na etapa de derivatização no preparo da amostra para análise em cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC)(DIN, 2003b; ASTM, 2010).

2.3.2. Teor de ésteres e de metanol

O biodiesel transesterificado compreende uma mistura de ésteres mono alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa. O teor de éster fornece o indicativo da conversão dos triglicerídeos em biodiesel. O desempenho ótimo de motores diesel requer pelo menos 98,8% de ésteres (WAWRZY尼亚K et al., 2005), já a legislação brasileira estabelece o mínimo de 96,5% utilizando a norma europeia EN 14103(DIN, 2003a). A norma estabelece a utilização da cromatografia gasosa com detector de ionização em chama e o método se baseia na comparação da área total dos picos dos ésteres e o pico do heptadecanoato de metila que é utilizado como padrão interno. A concentração dos ésteres poli-insaturados também deve ser controlada, pois oxidam facilmente. A quantificação é realizada pela comparação da área do pico referente aos ésteres poli-insaturados e área do pico do heptadecanoato de metila. O limite máximo de concentração dos poli-insaturados é de 15% (m/m) como previsto na norma. Existe ainda a norma ABNT NBR 15764 que deve ser utilizada quando a amostra é oriunda de gordura animal ou proveniente de duas ou mais matérias-primas sendo uma delas a mamona aplicando padronização externa (ABNT, 2012a).

A utilização do heptadecanoato de metila como padrão interno na análise do teor de ésteres deve-se ao fato de que este não está presente no biodiesel oriundo de matéria-prima vegetal. Entretanto, ele é um produto da reação de transesterificação quando se utiliza ácidos graxos de origem animal, e então para quantificação do teor de ésteres, faz-se necessário subtrair a quantidade daquele heptadecanoato de metila já presente no biodiesel. A versão atualizada da norma EN 14103 de 2012 utiliza nonadecanoato de metila como padrão interno, haja vista que esta substância não está presente no biodiesel proveniente de óleo vegetal e tampouco de gordura animal (DIN, 2012).

Com o intuito de desenvolver uma alternativa à utilização de heptadecanoato de metila como padrão interno, Marques et al. (2010), propuseram um método que utiliza oleato de etila com padrão interno para esta análise cromatográfica, pois esta substância não se encontra no biodiesel proveniente de rota metílica (MARQUES, et al., 2010). Em uma alíquota de aproximadamente 250 mg de amostra, foi adicionado 5 mL de uma solução 10 g.L^{-1} de oleato de etila em heptano. A separação foi obtida com sucesso utilizando uma amostra de biodiesel de soja em rota metílica (Figura 3), com a temperatura do injetor e do forno mantidas constantes a $220 \text{ }^\circ\text{C}$ e a do detector a $250 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente. Segundo os autores, o método desenvolvido apresenta resultados muito semelhantes àqueles fornecidos pela metodologia normatizada. Porém a utilização desta metodologia fica comprometida quando o biodiesel analisado for proveniente de rota etílica, haja vista que o oleato de etila é um produto da transesterificação desta rota.

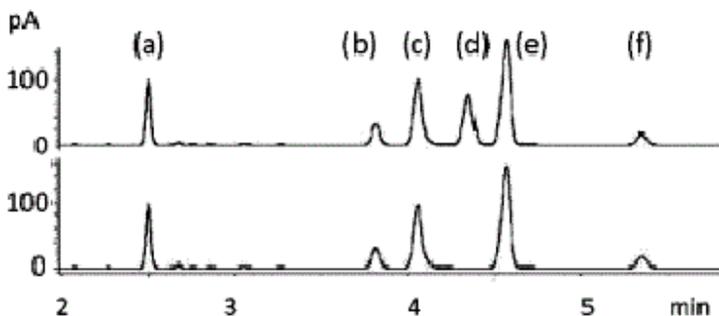


Figura 3 - Cromatograma de biodiesel metílico de óleo de soja: presença de oleato de etila (acima) e ausência de oleato de etila (abaixo); (a) palmitato de metila, (b) estereato de metila, (c) oleato de metila, (d) oleato de etila, (e) linoleato de metila, (f) linolenato de metila. Extraído de MARQUES, 2010.

Na literatura também tem sido relatada a determinação do teor de ésteres em biodiesel utilizando ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$). Este método baseia-se na razão entre a área total do singlete dos prótons da metila diretamente ligadas à carboxila do metil éster ($\text{CH}_3\text{OCO-}$) e a área total dos sinais dos hidrogênios metilênicos α -carbonílicos ($-\text{OCOCH}_2-$) (GELBARD et al., 1995).

Outro constituinte do biodiesel que é quantificado empregando-se a cromatografia gasosa é o metanol. O teor de metanol no biodiesel pode ser utilizado como parâmetro de qualidade no que diz respeito à etapa de purificação do combustível. Como o álcool é adicionado em excesso, uma etapa eficiente de recuperação é necessária, pois altos teores de metanol podem provocar a corrosão de metais, principalmente alumínio e diminuir o ponto de fulgor do biodiesel (BOOG et al., 2011).

Além disso, é um dos responsáveis pela diminuição do número de cetano e da lubrificidade do combustível. A legislação brasileira estabelece o limite máximo de 0,20 % de metanol residual no biodiesel. A determinação do teor de metanol pode ser feita utilizando cromatografia à gás com detector de ionização em chama. De acordo com a norma europeia EN 14110, a quantificação é realizada utilizando a técnica de amostragem e modo “*headspace*” onde os vapores de uma quantidade de amostra presente em um frasco hermeticamente fechado são analisados utilizando ou não 2-propanol como padrão interno (DIN, 2003c). Na norma ABNT NBR 15343, está prevista a análise de misturas de matérias-primas e permite a determinação simultânea de metanol e etanol pela injeção direta da amostra (ABNT, 2012b).

Alguns trabalhos da literatura apresentam formas de determinar metanol simultaneamente com outros componentes do biodiesel. Arzamedi et al. (2006) empregaram a cromatografia líquida por exclusão de tamanho para determinação simultânea de glicerina livre, mono-, di-, tri-glicerídeos, metanol e uma mistura de ésteres comercial conforme a Figura 4. A corrida cromatográfica foi à temperatura ambiente, tempo de aproximadamente

trinta minutos em três colunas ligadas em série e com detecção por índice de refração. A amostra foi injetada diretamente, sem nenhum pré-tratamento e, segundo os autores, o método desenvolvido foi simples, robusto com resultados precisos e reprodutivos. Porém, cabe ressaltar que o custo do equipamento e do sistema de colunas pode ser uma grande desvantagem.

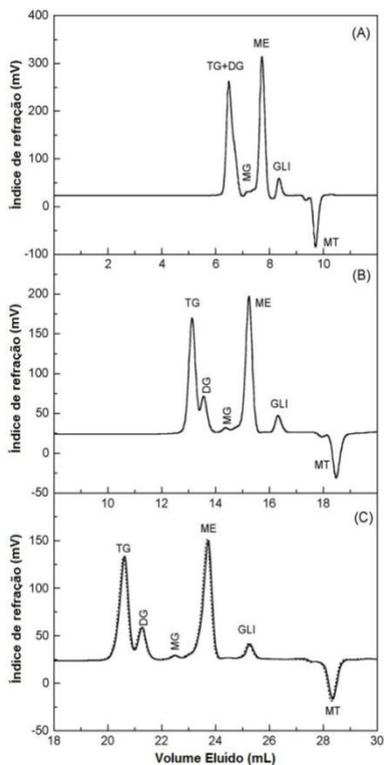


Figura4 -Cromatogramas obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho utilizando as seguintes configurações: (A) uma coluna HR0,5; (B) uma coluna HR2 ligada em série a uma coluna HR0,5; (C) duas colunas HR2 ligadas a uma coluna HR0,5. TG: triglicerídeos; DG: diglicerídeos; MG: monoglicerídeos; ME: mistura de ésteres; GLI: glicerina; MT: metanol. Extraído de ARZAMEDI et al., 2006.

A espectroscopia de infravermelho próximo foi utilizada por Knothe (1999), para monitoramento da transesterificação de óleo de soja. O sistema disposto de uma sonda de fibra ótica facilitou a análise direta das amostras compostas por misturas de óleo de soja e biodiesel metílico. A calibração multivariada foi utilizada para calibração e no caso da quantificação do teor de éster, as regiões em 6005, 4880 a 4885 cm^{-1} se mostraram características para a identificação dos ésteres conforme a Figura 5.

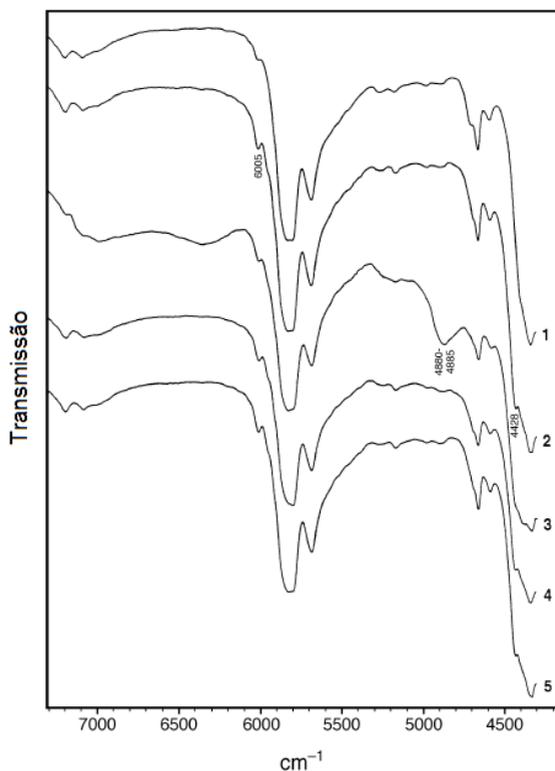


Figura 5 - Espectros de infravermelho próximo na região de 7300-4300 cm^{-1} de (1) óleo de soja puro; (2) biodiesel; (3) mistura de biodiesel metanol; (4) mistura de biodiesel e glicerina livre; (5) mistura de biodiesel e óleo de soja. Extraído de KNOTHE, 1999.

Para a quantificação do metanol, foi utilizada a região de 5500 e 4600 cm^{-1} . A calibração multivariada foi pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS - partial least squares). Com o método desenvolvido não foi possível identificar os componentes do biodiesel e o processo de calibração foi bastante demorado devido ao grande número de padrões utilizados.

A espectroscopia de infravermelho próximo também foi utilizada por Felizardo et al. em dois trabalhos. Nestes trabalhos foram utilizados ensaios de infravermelho para quantificar água e metanol em biodiesel tanto em escala industrial quanto laboratorial. Os modelos de calibração multivariada foram aplicados utilizando PLS, análise de componentes principais (PCA - principal components analysis) e regressão de componentes principais (PCR - principal components regression). Os resultados mostraram que a espectroscopia de infravermelho próximo pode ser utilizada em combinação com calibração multivariada para verificar a qualidade e identificar o tipo de óleo usado na produção do biodiesel (FELIZARDO et al., 2007a; FELIZARDO et al., 2007b).

Uma alteração da norma ABNT NBR 15343 foi proposta por Faria et al. na qual foi instalada uma válvula de reversão de fluxo no injetor do cromatógrafo e logo após a eluição do padrão interno, o fluxo da coluna foi revertido para fora do cromatógrafo, não permitindo que os componentes mais pesados do biodiesel percorressem toda a coluna. Neste trabalho, foi utilizada uma coluna de dimetilpolisiloxano e foi possível separar metanol, etanol e 2-propanol. Com isso o tempo de análise passou de 50 para menos de 10 minutos (FARIA et al., 2007).

Em 2008, Araújo et al. desenvolveram um método empregando membrana microporosa hidrofílica para retirar o metanol do biodiesel por um sistema de extração líquido-líquido. Ao ser retirado da fase orgânica, o metanol passava para uma solução tampão e a detecção ocorria depois da derivatização pela aplicação da enzima álcool oxidase imobilizada e posterior análise com ultravioleta em 240 nm (ARAUJO et al., 2008).

Paraschivescu et al.(2008) apresentaram um trabalho com uma adaptação da norma europeia EN 14110, pois neste trabalho os autores utilizaram um sistema de *headspace* por microextração de fase sólida composto por uma fibra de polidimetilsiloxano. Segundo os autores, o método proposto mostrou-se reprodutível, com sensibilidade e faixa analítica maiores que o método padrão, sem necessidade de padronização interna. Para quantificação do metanol foram necessárias duas curvas analíticas, sendo uma de segunda ordem para concentrações até 0,06 % (m/m) e outra de terceira ordem para concentrações entre 0,06 e 2,00 % (m/m) conforme mostrado na Figura 6.

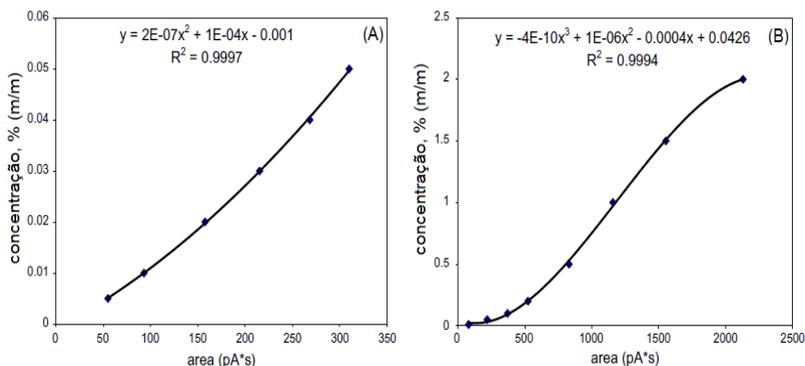


Figura 6 - Curvas analíticas para quantificação de metanol em biodiesel em diferentes faixas: (A) curva de segunda ordem para concentrações até 0,06 % (m/m); (B) curva de terceira ordem para concentrações entre 0,06 e 2,00 % (m/m). Extraído de PARASCHIVESCU et al., 2008.

Mittelbach et al. desenvolveram um método para determinação simultânea de metanol e glicerol livre em biodiesel realizando a derivatização destes com Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e posterior análise por CG-DIC. No método proposto pelos autores, todos os hidrogênios ativos das hidroxilas foram derivatizados e substituídos por grupos trimetilsilil e separados na corrida cromatográfica conforme mostrado na Figura 7. O método foi baseado na padronização interna com etanol e

1,2,4 butanotriol e a quantificação foi avaliada por CG-DIC e CG-EM e ambos mostraram sensibilidade suficiente para concentrações de metanol em biodiesel de acordo com as legislações aplicáveis.

Embora o método proposta por Mittelbach et al. tenha se mostrado viável, a condição cromatográfica se mostrou incompatível com a determinação cromatográfica atual da glicerina (EN 14105, ASTM D6584, NBR 15771)e, portanto, não pode ser diretamente aplicado para a determinação simultânea do metanol com mono-, di-, tri-glicerídeos, glicerina livre e glicerina total no biodiesel.

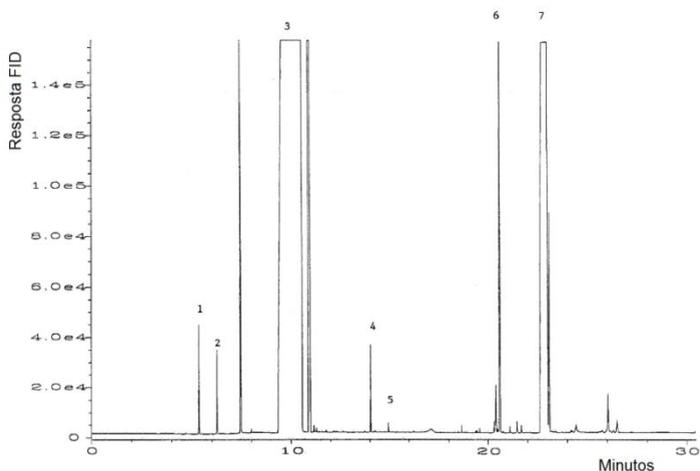


Figura 7 – Cromatograma de biodiesel de soja; 1 – Trimetilmetoxisilano; 2 – Trimetiletoxissilano; 3 – N,N-dimetilformamida; 4 – 1,4-Bis-(trimetilsiloxi)-butano; 5 – 1,2,3-Tris-(trimetilsiloxi)-propano; 6 – Palmitato de metila; 7 – Oleato, linoleato e linolenato de metila. Extraído de MITTLBACH et al., 1996b.

2.4. Derivatização

A derivatização é uma técnica aplicada em química que consiste em transformar compostos a fim de obter outros que possuam características aplicáveis em alguns métodos. Profissionais da área da cromatografia gasosa tem uma longa história com o uso de derivatizantes para conseguir aumentar a pressão de vapor do soluto, melhorar a estabilidade térmica, ou ainda adicionar um grupo funcional facilmente detectável. No caso da cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons, pode-se modificar o analito com a introdução de halogênios à molécula do analito e assim possibilitar a detecção deste (WIXOM, 2010).

Na cromatografia líquida também se pode utilizar da derivatização, geralmente, para adicionar um recurso de detecção ou para formar diastereoisômeros de uma mistura racêmica, por exemplo. Além disso, a derivatização serve para melhorar a solubilidade do soluto em uma determinada fase móvel, para eliminar ou impedir respostas de grupos funcionais problemáticos, e especificamente para melhorar a seletividade entre um analito de interesse e outro com o mesmo tempo de retenção (MCNAIR, 1997; WIXOM, 2010).

Os métodos de derivatização podem envolver tratamentos pré- e/ou pós-coluna e outros on- ou off-line. Para a formação de compostos mais voláteis para cromatografia gasosa, normalmente é utilizado o método off-line, onde a amostra é preparada em *vials* antes da injeção no cromatógrafo e a eficiência do procedimento depende de inúmeros fatores incluindo condições de reação como temperatura, agitação e tempo (DROZD, 1985).

Uma grande variedade de reações é empregada na preparação de derivatizados, e elas são classificadas dentro de categorias menores como, por exemplo, a alquilação de grupos OH (incluindo COOH), SH e NH, formando assim moléculas menos polares. Neste tipo de reação os hidrogênios ativos são substituídos por cadeias carbônicas e os produtos

podem ser ésteres, tioésteres e amidas. Bases como a piridina são utilizadas como catalisadores, todavia, pode levar a formação de produtos secundários bem como afetar a resolução do cromatograma (KNAPR, 1979; MCNAIR, 1979; WIXOM, 2010). A reação geral da alquilação é mostrada na Equação 1.



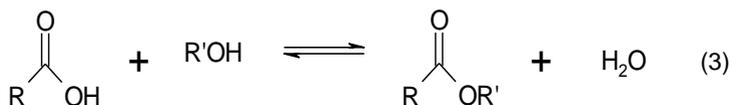
Outra reação de derivatização é a sililação que utiliza substâncias que fazem a introdução de grupos silil em compostos orgânicos pela substituição dos hidrogênios ativos. Os reagentes mais comuns são o N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) entre outros. A reatividade depende do impedimento estérico da molécula e geralmente as reações ocorrem instantaneamente e à temperatura ambiente (ENSSLIN et al., 1996; COLLINS et al., 2006). A reação geral da sililação é mostrada na Equação (2).



Há também a reação de condensação que consiste na união de duas moléculas seguida de perda de água. Desta forma, as reações de ácidos carboxílicos com alcoóis estão neste grupo. As oximas e as hidrazonas podem ter aplicações neste tipo de reação e na maioria dos casos, o produto é um composto volátil (KNAPP, 1979).

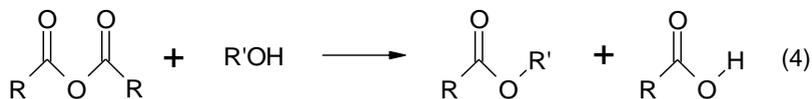
2.5. Formação de ésteres

Normalmente os ésteres são preparados por meio de reação de alcoóis, ou fenóis, com ácidos ou derivados de ácidos (ALLINGER, 1976; MORRINSON, 1996; SOLOMONS, 2005), embora outros métodos, menos usuais, utilizem a transformação dos ácidos em amidas e posterior conversão a ésteres (CAREY, 2007). Dentre os métodos mais utilizados está a formação de ésteres a partir de ácidos, uma vez que os ácidos carboxílicos reagem com alcoóis para formar ésteres através de uma reação de condensação conhecida como esterificação. A reação geral da esterificação é mostrada na Equação (3).



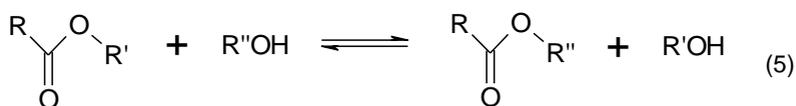
Na ausência de catalisadores, esta reação ocorre de forma muito lenta, já na presença de ácidos fortes concentrados a reação recebe o nome de “esterificação de Fischer” e atinge equilíbrio em poucas horas. A reatividade dos alcoóis depende de suas configurações, assim alcoóis primários são mais reativos que os secundários que por sua vez, são mais reativos que os terciários (SOLOMONS, 2005). Quando um catalisador fortemente ácido é utilizado, esta reação não pode envolver alcoóis terciários, que sofrem eliminação facilmente nestas condições, originando vários subprodutos como os alcenos por exemplo.

Outra forma de obtenção de ésteres utiliza anidridos que reagem com álcool para formar um éster e um ácido carboxílico. O mecanismo desta reação é similar ao da reação de cloretos de acila com alcoóis, conforme mostrado na Equação (4).



A reação é favorecida em meio básico e a piridina é usada mais frequentemente como catalisador. Os anidridos cíclicos reagem com um equivalente em quantidade de matéria de um álcool para formar compostos que são tanto ésteres quanto ácidos (MARCH, 1992; SOLOMONS, 2005). Neste método deve-se utilizar anidridos simétricos, nos quais as duas “metades” da molécula são originadas de um mesmo ácido carboxílico, pois em caso contrário seriam obtidas misturas de dois ésteres diferentes.

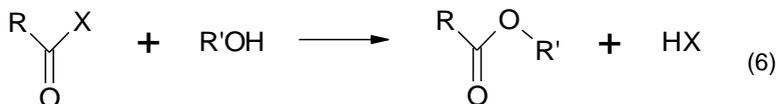
Também é possível se obter ésteres a partir de outros ésteres empregando-se a transesterificação que é amplamente utilizada para a obtenção de biodiesel. É uma reação de equilíbrio e deve ser deslocado na direção desejada, conforme mostrado na Equação (5). Em muitos casos, os ésteres de baixo ponto de ebulição podem ser convertidos em ésteres de maior ebulição por destilação do álcool que possui o ponto de ebulição mais baixo (MARCH, 1992).



A obtenção de ésteres por este processo pode ser realizada tanto em meio ácido quanto em meio básico. Assim como no caso da esterificação, a transesterificação em meio ácido impossibilita a utilização de alcoóis terciários pela formação de subprodutos como alcenos (MARCH, 1992; SOLOMONS, 2005).

O método mais eficiente para o preparo de ésteres utiliza reações entre haletos de acila e alcoóis ou fenóis. A reação tem inúmeras aplicações, haja vista que vários grupos funcionais não interferem na

reação. A reação geral da formação de ésteres a partir de um haleto de acila e álcool é mostrada na Equação (6). Uma base normalmente é utilizada para combinar com o ácido formado e nessas condições a reação é conhecida como “*procedimento de Scotten-Baumann*” (MARCH, 1992).



Os cloretos de acila são preferencialmente utilizados por serem muitos mais reativos frente à adição nucleofílica-eliminação do que os ácidos carboxílicos. A piridina é comumente adicionada à mistura da reação para reagir com o HCl formado. Além disso, a piridina pode reagir com o cloreto de acila para gerar o íon acilpiridínio, que por sua vez, é um intermediário até mais reativo frente a um nucleófilo do que o cloreto de acila (CAREY, 2000; SOLOMONS, 2005).

2.6. Validação de métodos

Muitas decisões importantes são baseadas em resultados de análises quantitativas como, por exemplo, especificações de quantidade e limite, estimativas de valores monetários, ou ainda certificação de rendimentos reacionais (EURACHEM, 2002). Por isso, métodos analíticos confiáveis são necessários para o cumprimento dos regulamentos nacionais e internacionais em todas as áreas de análise e a validação de um método é um componente essencial que um laboratório deve implementar para permitir a produção de dados analíticos confiáveis (THOMPSON et al. 2002).

A validação de um método é um processo contínuo, que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo seu

desenvolvimento e implantação, com o objetivo de confirmar que este método é apropriado para o uso pretendido. O estudo dos parâmetros de validação deve ser realizado com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando de forma correta e devidamente calibrados e esse processo deve ser documentado em um procedimento (INMETRO, 2011). Vários guias podem ser utilizados como referência para o planejamento da validação. No Brasil, o documento INMETRO-DOQ-CGCRE-008(INMETRO, 2011) tem destaque como material de apoio para validação de métodos analíticos e envolve estudos de seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação, tendência, precisão, exatidão e robustez que devem estar declarados no procedimento analítico.

2.6.1. Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (RIBANI et al., 2004). Um exemplo é a aptidão de um espectrômetro de massa para medir a razão entre correntes iônicas geradas por dois componentes especificados, sem interferência de outras fontes especificadas de corrente elétrica (INMETRO, 2009).

2.6.2. Linearidade

O termo linearidade está relacionado com a resposta de uma técnica ou equipamento em função da concentração do analito, que devem ser estudados em um determinado intervalo de tempo (LANÇAS, 2004). A linearidade pode ser encontrada por curvas analíticas através de regressão

linear e vários autores sugerem o mínimo de 5 pontos para a construção de curva analítica (ALBANO, 2009; INMETRO, 2011).

2.6.3. Faixa de trabalho e faixa linear

Em todos os métodos quantitativos de análise existe uma faixa de resposta linear em relação à concentração do analito e essa característica determina como o método pode ser aplicado. Por conveniência, a extensão da faixa linear equivale a faixa de trabalho, ou seja, a aplicação é estendida até o ponto em que os resultados não apresentam grandes desvios e são confiáveis (INMETRO, 2011). Em geral, o limite superior da faixa corresponde à concentração na qual o sinal analítico apresenta uma variação de 5% em relação a equação tomada como linear, e o limite inferior da faixa equivale ao limite de detecção (SKOOG et al., 2007).

2.6.4. Limite de detecção

O limite de detecção pode ser definido como a menor quantidade que pode ser detectada com uma certeza razoável, para um determinado procedimento analítico (CURRIE, 1999). No caso de aplicação de equipamentos eletrônicos, o limite de detecção está diretamente relacionado com o nível de ruído e passa a ser chamado de limite de detecção do equipamento. Assim o limite de detecção pode ser calculado tomando como base a relação sinal-ruído na proporção de 3:1 ou 2:1 (ALBANO, 2009).

Em outros casos, o limite de detecção do método pode ser determinado utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído

e sinal analítico pela verificação da menor concentração visível (detectável) (RIBANI et al., 2004).

2.6.5. Limite de quantificação

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (LANÇAS, 2004). Para sua determinação utiliza-se, normalmente, o padrão de menor concentração (INMETRO, 2010), ou ainda, os dados de desvio padrão obtidos no cálculo do limite de detecção, alterando o fator de 3 para 5, 6 ou 10, dependendo do nível de confiança estabelecido (EURACHEM, 1998).

2.6.6. Tendência/Recuperação

A tendência ou recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI et al., 2004). Para tal procedimento, pode-se utilizar materiais de referência certificados (MRC), participação em ensaio interlaboratoriais e ainda a adição de padrão à uma amostra isenta do analito. Os dados da recuperação permitem avaliar a exatidão, e na maioria dos casos, valores de recuperação entre 70 e 120 % são aceitos (LANÇAS, 2004; INMETRO, 2011).

2.6.7. Precisão e Exatidão

Embora estes termos pareçam iguais, existem diferenças significativas entre eles. A precisão está relacionada com a reprodutibilidade de um resultado. Isso significa que os resultados podem estar próximos uns aos outros ou até mesmo serem iguais, porém não correspondem ao valor real. Já a exatidão corresponde à proximidade com o valor verdadeiro (LANÇAS, 2004). A precisão pode ser determinada pela razão, em porcentagem, entre o desvio padrão das medidas e a média destas. Já a exatidão é determinada com materiais de referência, métodos diferentes ou ensaios de recuperação (HARRIS, 2005).

2.6.8. Robustez

A robustez pode ser definida como a capacidade de um procedimento analítico permanecer inalterado por pequenas variações introduzidas no método fornecendo uma indicação de confiabilidade durante o uso normal (EURACHEM, 1998; HEYDEN, 1999; JIMIDAR et al. 1999). No caso da cromatografia líquida, por exemplo, a robustez é verificada quando pequenas alterações da composição do solvente ou do pH do meio não causam variações nos resultados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar uma metodologia para a determinação simultânea dos teores de éster e metanol em biodiesel.

3.2. Objetivos específicos

Otimizar a reação de esterificação do metanol em biodiesel empregando-se cloretos de acila;

Otimizar os parâmetros da corrida cromatográfica dos compostos utilizando como referência a norma EN 14103:2003;

Validar a metodologia proposta;

Quantificar o metanol no biodiesel simultaneamente com os ésteres;

Validar a metodologia proposta.

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes, padrões e biodiesel

Dentre os reagentes a piridina (99,9%), heptadecanoato de metila (99%) e os cloretos de heptadecanoíla (99%), octanoíla (99%), nonanoíla (96%) e decanoíla (99%) foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich. Além destes, também foram utilizados metanol (J.T. Baker, HPLC), heptano (Macron, HPLC), 2-propanol (Vetec, P.A., 99,7%) e diclorometano (Tedia, HPLC) e F.A.M.E. Mix (Supelco, 37 componentes).

O biodiesel utilizado foi de doação de uma indústria localizada em Mato Grosso, proveniente da transesterificação de óleo de soja degomado em rota metílica com 0,6% (m/m) de catalisador básico em um lote de 620000 litros.

4.2. Preparo dos padrões

Inicialmente, o biodiesel foi aquecido a $110 \pm 10^\circ \text{C}$ sob agitação magnética por 1,5 h para eliminação do metanol residual. A eliminação do metanol foi verificada por análises cromatográficas segundo a norma EN 14110. A partir desta amostra os padrões foram preparados utilizando como referência o procedimento descrito da norma EN 14110. Para tal, foi preparado um padrão 0,5% (m/m) de metanol em biodiesel e posteriormente, por diluição em biodiesel seco, foram obtidos os padrões de 0,3; 0,1; 0,05 e 0,01% (m/m), além do branco. Destes padrões, os níveis 0,5; 0,1 e 0,01 % foram empregados na curva analítica para determinação do metanol por *headspace* (EN 14110). Por outro lado, na metodologia de

determinação simultânea o metanol foi quantificado por calibração externa em uma curva analítica construída com os seis níveis de metanol derivatizado na forma de éster metílico, possibilitando a análise nas condições cromatográficas da norma EN 14103, de quantificação do teor de éster em biodiesel.

4.3. Condições cromatográficas

As análises cromatográficas para determinação do metanol segundo a norma EN 14110 foram realizadas em triplicata nos três níveis de concentração (0,5; 0,1 e 0,01% (m/m)) em um cromatógrafo a gás Shimadzu CG 2010 equipado com autoamostrador AOC – 5000 em modo *headspace*, injetor em modo *split*, detector de ionização em chama (DIC) e *software CGSolution* para tratamento de dados. Uma coluna de fase apolar RestekRtx - 1 (100% dimetilpolisiloxano) com dimensões de (30 m x 0,32 mmi.d.x 3 µm) foi usada com as condições cromatográficas listadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições cromatográficas segundo a norma EN 14110

Característica	Condição
Gás de arraste	Hélio
Modo de controle do fluxo	Velocidade linear, 50 cm/s
Razão do <i>split</i>	1:50
Temperatura do injetor	150 °C
Temperatura do detector	150 °C
Programa de temperatura do forno	Isotérmico a 50 °C
Tempo de análise	10 minutos
Volume de injeção	500 µL (<i>headspace</i>)
Temperatura de equilíbrio	80 °C
Tempo de equilíbrio	45 minutos

As análises cromatográficas na metodologia proposta para determinação simultânea do teor de éster e metanol foram realizadas no mesmo cromatógrafo a gás Shimadzu CG 2010 equipado com detector de ionização em chama (DIC), injetor em modo *split* e autoamostrador para injeção de amostras líquidas, coluna de fase polar de polietilenoglicol (RestekStabilwax) com dimensões de (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm).As mesmas condições cromatográficas especificadas na norma EN 14103 foram adotadas conforme a Tabela 3.

Tabela 3 – Condições cromatográficas para a metodologia desenvolvida

Característica	Condição
Gás de arraste	Hélio
Modo de controle do fluxo	Velocidade linear, 45 cm/s
Razão do <i>split</i>	1:50
Temperatura do injetor	250 °C
Temperatura do detector	250 °C
Programa de temperatura do forno	120 °C com permanência por 2 minutos, 10 °C por minuto até 180 °C com permanência por 3 minutos, 5 °C por minuto até 230 °C com permanência por 2 minutos.
Tempo total de análise	32 minutos
Volume de injeção	1 µL

4.4. Reação de derivatização e preparo das amostras

Inicialmente, foi realizado o estudo da reação de derivatização, utilizando cloretos de heptadecanoíla, octanoíla, nonanoíla e decanoíla a fim de obter os melhores resultados de conversão. Em *vials*, 20 µL de piridina (catalisador) e de cada haleto de acila foram adicionados em alíquotas de 250 ± 1 mg de biodiesel com 0,1% (m/m;) de metanol. As amostras foram agitadas manualmente por um minuto e a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos.

Os cloretos de acila são muito reativos principalmente com água e hidroxilas. Conhecendo estas características, foi necessário consumir todo excesso destes cloretos de acila a fim de proteger a coluna cromatográfica

composta de polietilenoglicol. Isso foi realizado pela adição de 40 µL de 2-propanol ao final da reação, deixando a solução reagir mais 10 minutos à temperatura ambiente. Ao realizar esta etapa, foi notada a formação de um material sólido esbranquiçado.

Após o término da reação, foram adicionados às amostras derivatizadas, 5 mL de solução padrão de 10g.L⁻¹ de heptadecanoato de metila em heptano conforme a norma EN 14103. O material sólido esbranquiçado se mostrou insolúvel em heptano. Alguns padrões comerciais de misturas de ésteres disponíveis no mercado utilizam diclorometano como solvente, por isso foi decidido preparar a solução padrão de 10 g.L⁻¹ de heptadecanoato de metila em diclorometano para testar a solubilidade do material derivatizado neste solvente. Com diclorometano, foi observada a solubilização total do material.

4.5. Validação do método

O método desenvolvido foi validado conforme as instruções do documento de caráter orientativo – DOQ-CGRE-008 – Orientação sobre validação de métodos analíticos – emitido pelo INMETRO em Julho de 2011. Os parâmetros e a estratégia utilizados estão descritos logo a seguir.

4.5.1. Seletividade

O estudo da seletividade envolveu duas etapas utilizando um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG 17A acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu QP5050A com fonte de ionização por impacto eletrônico, em modo *scan*, voltagem do filamento de 70 eV e voltagem do detector de 1,65 kV. Primeiramente, foram injetadas amostras da reação de derivatização, na ausência do biodiesel para avaliar os produtos formados,

bem como os reagentes em excesso. Na segunda parte, foi investigada a seletividade da reação de derivatização em amostras de biodiesel contendo metanol.

Além desses experimentos por CG-EM, a seletividade do método foi avaliada na presença de etanol por meio de corridas cromatográficas por CG-DIC da amostra de biodiesel contendo metanol e/ou etanol.

4.5.2. Linearidade e faixa de trabalho

Para demonstrar a linearidade do método, foi construída uma curva analítica com seis níveis de concentração de metanol no intervalo estabelecido como faixa de trabalho tendo como referência a norma oficial para determinação do metanol em biodiesel – EN 14110. Nessa norma utilizam-se padrões com concentração de até 0,5% (m/m) de metanol, haja vista que a legislação vigente estabelece o limite máximo de 0,2% (m/m).

Os níveis de concentração de metanol em biodiesel preparados foram 0,00; 0,01; 0,05; 0,10; 0,30; e 0,50% (m/m). Como critério de aceitação foi definido 0,95 como o valor mínimo do coeficiente de correlação da curva analítica, conforme a norma EN 14110.

4.5.3. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção do método desenvolvido foi obtido a partir da análise do branco da amostra. Nesse caso sete alíquotas individuais do biodiesel foram secas, derivatizadas e analisadas. O valor do limite de detecção foi obtido através da Equação (7)

$$LD = \bar{X} + t_{(n-1,1-\alpha)} \cdot S \quad (7)$$

onde \bar{X} é média dos valores dos brancos da amostra, t é distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e s é desvio-padrão amostral dos brancos da amostra.

No caso de sete amostras, tem-se 6 graus de liberdade, e o valor de t unilateral é 3,143, para 99 % de confiança.

Para o limite quantificação do método desenvolvido foi adotado o valor do padrão de menor concentração da curva analítica para a determinação do teor de metanol.

4.5.4. Tendência/recuperação

Foram preparadas amostras com concentração de metanol conhecida nos níveis de concentração de 0,02; 0,2 e 0,4 % (m/m). Assim, foi avaliada numericamente quão exata se mostrou a metodologia proposta. Além disso, a recuperação também foi determinada utilizando a metodologia oficial a fim de comparar a recuperação do método proposto.

4.5.5. Precisão

A precisão foi obtida pelo estudo da repetitividade e da precisão intermediária. Para a primeira, três amostras foram preparadas em diferentes níveis de concentração de metanol em biodiesel – 0,02; 0,16 e 0,40 % (m/m). No caso da precisão intermediária, dois analistas prepararam e analisaram uma mesma amostra. Os tratamentos matemáticos seguiram conforme o documento de orientação do INMETRO.

4.5.6. Robustez

A robustez da metodologia desenvolvida foi estudada com variações nos parâmetros considerados críticos na análise. Dentre esses fatores, estão o tempo de reação de derivatização, o volume de piridina utilizado, o analista e a razão do *split* conforme a Tabela 4. O modelo estatístico utilizado para análise dos dados foi o de comparação de pares de duas amostras com variâncias equivalentes e as diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste *t* de student com 95% de confiança.

Tabela 4 – Modelo aplicado para determinação da robustez do método

Experimentos Parâmetros	A	B	C	D	E
Tempo de reação (min)	10	10	15	10	10
Volume de piridina (μ L)	20	25	20	20	20
Analista	A	A	A	A	B
Razão do <i>split</i>	50	50	50	75	50

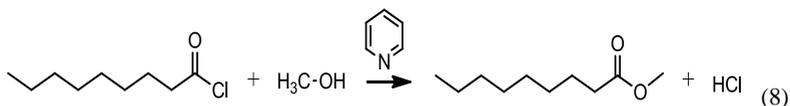
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo da reação de derivatização

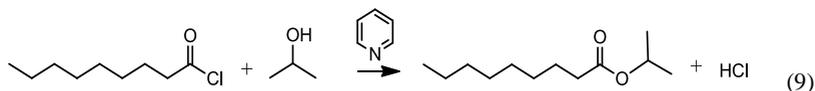
O método proposto para determinação de metanol foi baseado na derivatização a fim de obter éster de cadeia mais curta que aqueles presentes no biodiesel, possibilitando a quantificação cromatográfica simultânea ao teor de ésteres com base na norma EN 14103:2003.

Inicialmente, foram escolhidos quatro cloretos de acila para a reação de derivatização (cloretos de heptanoíla, octanoíla, nonanoíla e decanoíla). Os estudos iniciais mostraram melhores resultados com o cloreto de nonanoíla uma vez que não foi possível realizar a separação cromatográfica sem modificações no método quando foi empregado o cloreto de heptanoíla. No caso dos cloretos de octanoíla e decanoíla, os resultados mostraram a formação de octanoato e decanoato de metila respectivamente. No entanto, como estes ésteres são encontrados naturalmente no biodiesel de algumas matérias-primas como, por exemplo, o babaçu e o coco, o estudo na reação de derivatização a partir dos cloretos de octanoíla e decanoíla foi descartado (CANAKCI, 2003).

A reação esperada para a derivatização do metanol a partir do cloreto de nonanoíla é apresentada na Equação 8.



Em função da reatividade dos cloretos de acila foi necessário consumir todo o cloreto de nonanoíla adicionado em excesso, haja vista que estes poderiam atacar os grupos funcionais da coluna cromatográfica de polietilenoglicol. Para isso, foi utilizado 2-propanol cuja reação envolve a formação do nonanoato de propila como mostrado na Equação 9.



Ao final da reação entre cloreto de nonanoíla e 2-propanol foi observado a formação de um material sólido como apresentado na Figura 8a. A solubilidade deste precipitado foi testada em heptano, que é o solvente utilizado segundo a norma EN 14103 para a determinação de ésteres. Como pode ser observado no frasco à esquerda na Figura 8b, os produtos formados na reação são pouco solúveis em heptano. Diante disso, foi testada a solubilidade em diclorometano e, conforme mostrado no frasco à direita na Figura 8b, a solubilização foi completa.

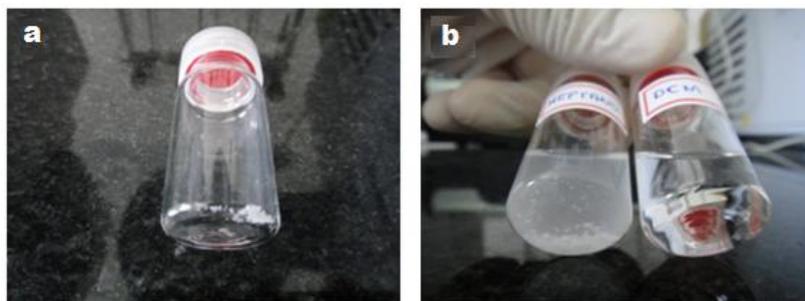


Figura 8 – Produto da derivatização. a) material sólido branco formado. b) material sólido dissolvido em heptano (esquerda) e material sólido dissolvido em diclorometano (direita).

Além da solubilidade, a otimização da reação envolveu o estudo do tempo de reação e da concentração de piridina para garantir o consumo do metanol presente no biodiesel.

Em alíquotas de 250 ± 1 mg de biodiesel, foram adicionados piridina e 20 μ L do cloreto de nonanoíla deixando a solução em repouso por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 40 μ L de 2-propanol e esperou-se mais 10 minutos. A confirmação da derivatização completa do metanol foi realizada segundo a norma EN 14110 não tendo sido detectada a presença de metanol após as etapas descritas.

Posteriormente, em alíquotas individuais de biodiesel, diferentes volumes de piridina foram adicionados a fim de otimizar a reação de derivatização. Foram utilizados 0,5; 5,0; 10 e 20 μ L de piridina e a verificação da ausência de metanol residual foi realizada conforme a norma EN 14110. Outros ensaios foram realizados utilizando 20 μ L de piridina e 10 minutos de reação com a temperatura variando entre 19°C e 21°C. O metanol não foi detectado quando foi utilizado volumes de piridina maiores que 10 μ L.

Após o estudo das condições ótimas para reação e utilizando as condições cromatográficas segundo a norma EN 14103, foram obtidos os cromatogramas para avaliação comparativa entre a metodologia oficial e a proposta, conforme as Figuras 9 e 10. Na amostra inicial, sem derivatização (Fig. 9) foram observados seis picos principais que foram identificados utilizando um padrão Mix FAME para ésteres metílicos. São eles: 1 – C16:0 palmitato de metila; 2 – C17:0 heptadecanoato de metila; 3 – C18:0 estearato de metila; 4 – C18:1 oleato de metila; 5 – C18:2 linoleato de metila; 6 – 18:3 linolenato de metila.

Na amostra derivatizada, estes picos de 1 a 6 estão presentes sem alterações e foi verificado o aparecimento de picos nos tempos de retenção 1,89; 3,00; 3,68; 4,00 e 11,83 minutos, conforme a Figura 10. A identificação qualitativa dos picos de 7 a 11 foi realizada a partir dos cromatogramas e espectros de massas dos reagentes e produtos da reação entre cloreto de

nonanoíla, metanol, 2-propanol e piridina, na ausência de biodiesel. Como verificado na Figura 11, o cromatograma dos produtos dessa reação apresenta somente os picos de 7 a 11, confirmando tratar-se de espécies químicas associadas com a reação de derivatização.

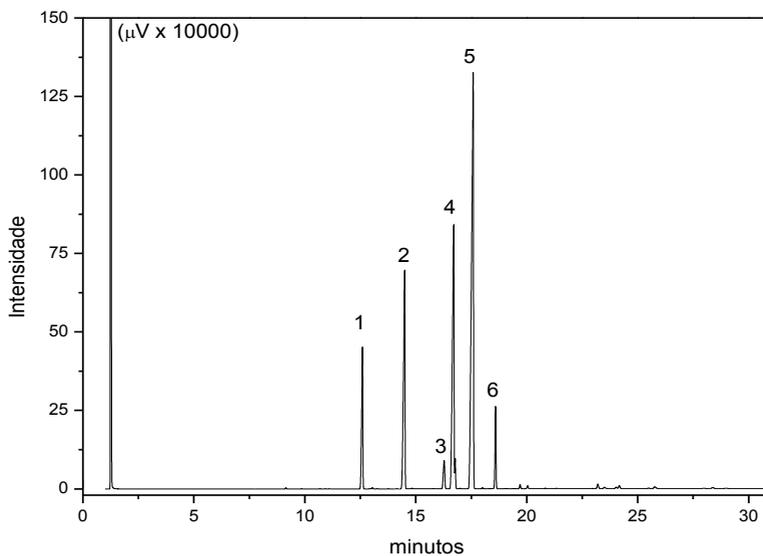


Figura 9 – Cromatograma obtido por CG-DIC de uma análise de quantificação do teor de ésteres em amostras de biodiesel de soja utilizando a norma EN 14103. 1 – C16:0 palmitato de metila; 2 – C17:0 heptadecanoato de metila; 3 – C18:0 estearato de metila; 4 – C18:1 oleato de metila; 5 – C18:2 linoleato de metila; 6 – C18:3 linolenato de metila.

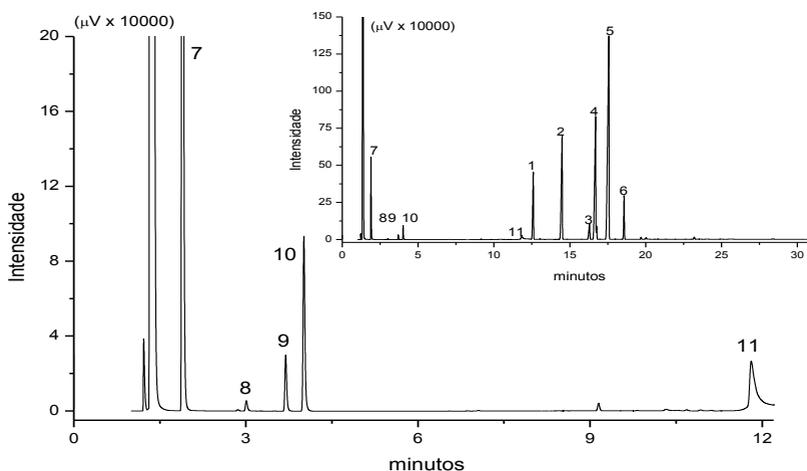


Figura 10 – Cromatograma obtido para amostra de biodiesel contendo metanol derivatizado com cloreto de nonoila na presença de 2-propanol e piridina. Detalhe refere-se ao tempo total da corrida cromatográfica. 7 – piridina; 8 – 2-metil-octanoato de metila; 9 C9:0 –nonanoato de metila; 10 – nonanoato de propila; 11 – 14-metil-pentanoato de metila.

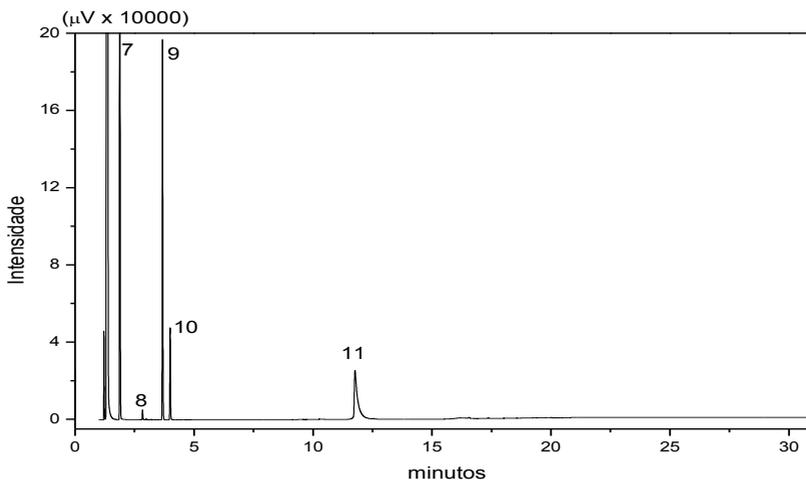


Figura 11 – Cromatograma obtido do material derivatizado na ausência de biodiesel. 7 – piridina; 8 – 2-metil-octanoato de metila; 9 C9:0 – nonanoato de metila; 10 – nonanoato de propila; 11 – 14-metil-pentanoato de metila.

O pico com tempo de retenção de 1,89 minutos (pico 7) é referente à piridina e foi confirmado em uma corrida cromatográfica deste reagente como é mostrado na Figura 12 e no resultado obtido por CG-EM (Fig. 13) que comprova a piridina com 89% de similaridade de acordo com a biblioteca de espectros de massa onde verifica-se todos os fragmentos de massa da piridina, empregada como catalisador na reação de derivatização.

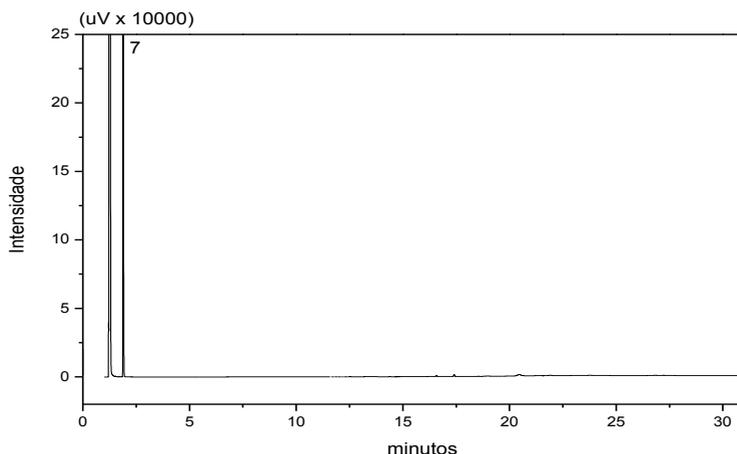


Figura 12 – Cromatograma obtido na injeção da piridina.

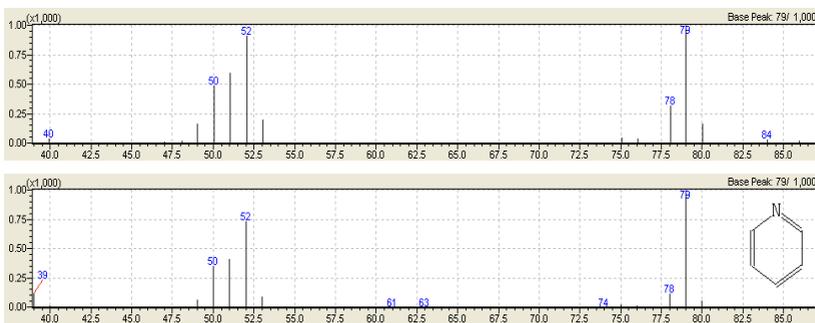


Figura 13– Comparação entre os espectros de massas da piridina e da referência para identificação da piridina

Para os demais picos, foram obtidos os espectros de massa apresentados nas Figuras 14 a 17. No tempo de retenção de 3,00 minutos (pico 8), o resultado encontrado por CG-EM, com 96% de similaridade, indicou 2-metil octanoato de metila. Esse produto pode ser oriundo de impurezas do cloreto de nonanoíla (96%). Na Figura 14 pode-se comparar o espectro da amostra e o de referência.

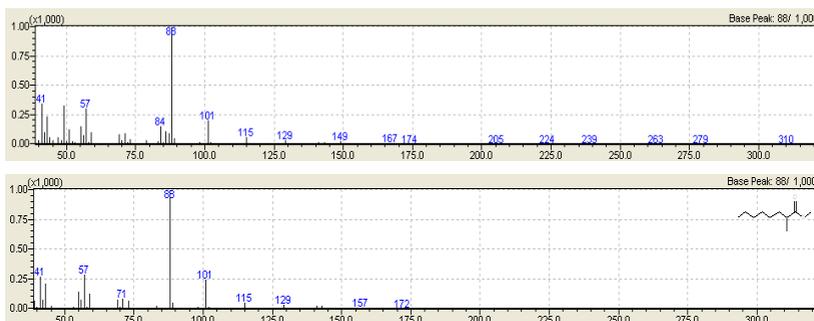


Figura 14 – Comparação entre os espectros de massas obtidos do pico 8 ($t_R = 3,00$ min) e de referência do 2-metil octanoato de metila

Para o pico encontrado em 3,68 minutos (pico 9) os espectros de CG (Figura 15), indicam com 95% de similaridade, que se trata do nonanoato de metila que é o produto de interesse quantitativo da reação de derivatização. Neste caso, a resolução obtida foi de 1,75 em relação ao pico mais próximo, demonstrando separação completa dos demais picos.

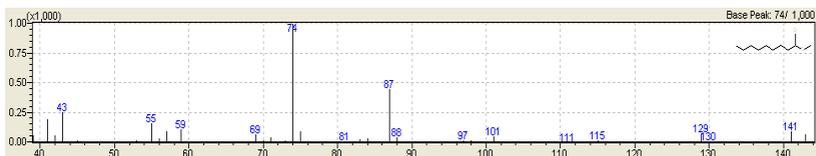
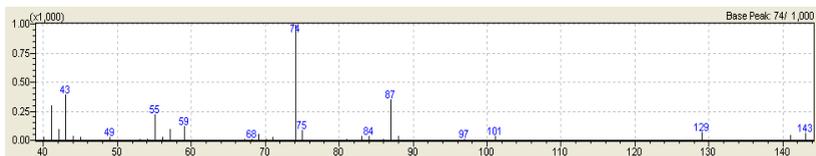


Figura 15 – Comparação entre os espectros de massas obtidos para o pico 9 ($t_R = 3,68$ min) e de referência do nonanoato de metila

O pico 10 observado em 4,00 minutos refere-se ao nonanoato de propila que é formado ao se adicionar 2-propanol para consumir todo cloreto de nonanoíla adicionado em excesso. Este éster foi confirmado com 92% de similaridade conforme os espectros da amostra e de referência mostrados na Figura 16.

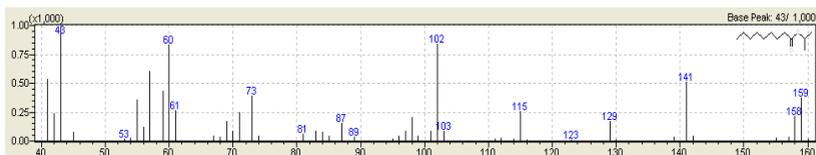
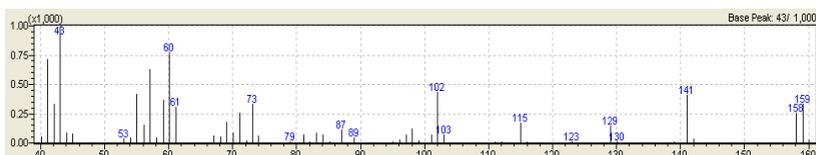


Figura 16 – Comparação entre os espectros de massas obtidos do pico 10 ($t_R = 4,00$ min) e de referência do nonanoato de propila

Por fim, a Figura 17 mostra a comparação entre o espectro da amostra e o de referência para o pico 11 com tempo de retenção

11,83minutos, confirmado com 91% de similaridade, trata-se do 14-metil-pentadecanoato de metila, que pode ter sido proveniente também de impurezas do cloreto de nonanoíla.

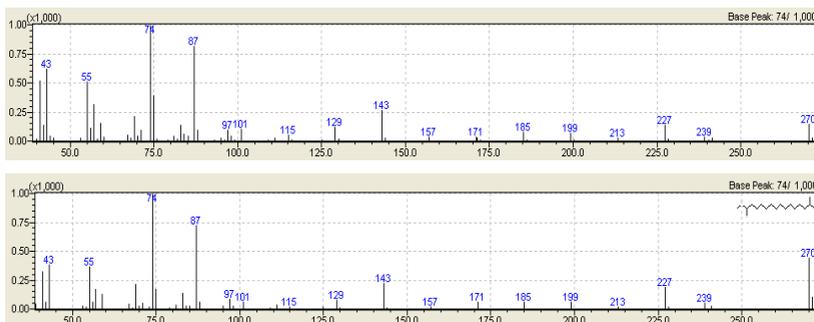


Figura 17 – Comparação entre os espectros de massas do pico 11 ($t_R = 11,83$ min) e de referência do 14-metil-pentadecanoato de metila

5.2. Estudo de interferência da derivatização no teor de éster

Os ésteres são os componentes majoritários do biodiesel e foi necessário verificar a possibilidade de interferência na quantificação destes ésteres na presença dos reagentes e produtos provenientes da derivatização do metanol. A determinação dos teores de éster em amostras de biodiesel sem e com derivatização foi realizado conforme o procedimento descrito na norma EN 14103:2003, onde a quantificação é realizada pela relação entre o pico do heptadecanoato de metila (C17:0) utilizado como padrão interno e a somatória de todos os picos compreendidos entre o miristato de metila (C14:0) e o éster metílico derivado do ácido nervônico (C24:1), conforme a Equação 10.

$$C = \frac{(\Sigma A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100\% \quad (10)$$

Onde C é a concentração de ésteres, expresso como uma fração de massa em porcentagem; ΣA é a área total dos picos dos ésteres metílicos em $C_{14:0}$ até o $C_{24:1}$; A_{EI} é a área do pico correspondente ao heptadecanoato de metila; C_{EI} é a concentração do padrão, em miligramas por mililitro; V_{EI} é o volume, em mililitros, da solução de heptadecanoato de metila; m é a massa, em miligramas, da amostra.

Na utilização desta equação foi necessário excluir o pico 11 (11,83 min), pois se tratava de um composto formado na adição do cloreto de nonanoíla como discutido anteriormente. Na Tabela 5, encontram-se os valores para o teor de ésteres obtidos no cromatograma com produtos da derivatização bem como os valores da amostra padrão de biodiesel.

Tabela 5 – Resultados encontrados na determinação do teor de ésteres

		Teor de ésteres, % (m/m)		
Amostra sem derivatização		Amostra derivatizada		
		0,02% de metanol	0,2% de metanol	0,45% de metanol
	97,34	98,27	97,10	98,10
	97,37	98,72	97,44	97,98
	97,01	98,29	97,43	98,00
	-	98,05	97,64	97,95
	-	97,82	97,66	97,94
	-	97,77	97,61	97,87
	-	97,84	97,65	97,75
Média	97,24	98,11	97,50	97,94
Desvio padrão	0,02	0,34	0,20	0,11
DPR (%)	0,02	0,35	0,21	0,11

De acordo com os resultados obtidos, não houve variação significativa na quantificação do teor de ésteres pela metodologia desenvolvida após a derivatização, haja vista que a norma EN 14103 permite para a repetitividade e reprodutibilidade a variação de 1,6 e 3,1% (m/m), respectivamente, enquanto que os resultados encontrados foram 1,0% (m/m) para o caso de maior variação entre os resultados obtidos em um nível de concentração de metanol e 1,6 % (m/m) no caso diferença entre

o máximo e o mínimo levando em consideração os três níveis de concentração de metanol em biodiesel. Além disso, o valor médio da quantificação para os três níveis de concentração das amostras derivatizadas foi de 97,85 % (m/m), bem próximo do valor encontrado para a amostra sem derivatização (97,24 %). Foi realizado o teste ANOVA com fator único para comparação entre os dois métodos. O resultado de F calculado foi de 3,343 sendo que o F tabelado para 95% de confiança é de 4,325. Portanto não há diferença significativa entre os resultados obtidos entre os dois métodos para a determinação do teor de éster.

5.3. Validação da metodologia analítica para determinação do metanol

5.3.1. Seletividade

Para verificar a seletividade do método na identificação e quantificação do metanol derivatizado na forma de nonanoato de metila, foi obtido o espectro de massas com as mesmas condições cromatográficas daquelas aplicadas utilizando CG-DIC, conforme já foi apresentado na Figura 15. Além disso, também foram realizados ensaios com uma amostra de biodiesel contendo mistura de etanol e metanol para verificar a seletividade do método, haja vista que o etanol pode ser um álcool substituto para a reação de transesterificação. Os cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 18, com detalhe na região do intervalo entre 3,5 e 4,5 minutos.

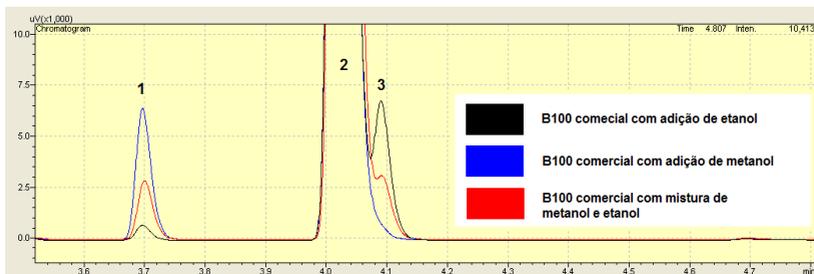


Figura 18 – Cromatograma da separação de metanol e etanol do método desenvolvido

O pico 1 é referente ao nonanoato de metila, o pico 2 é referente ao nonanoato de propila e o pico 3 ao nonanoato de etila. De acordo com os resultados, foi possível separar com eficiência o metanol do etanol na forma de ésteres derivatizados.

5.3.2. Linearidade e faixa de trabalho

Para a escolha da faixa de trabalho, foi levado em consideração o limite máximo de metanol permitido pela Resolução N. 14 de 2012 e também previsto na norma EN 14110. Assim, a curva analítica foi obtida partindo-se de amostras de biodiesel seco, com concentração de metanol até 0,5% (m/m). Os mesmos padrões foram empregados para construção de uma curva analítica para a quantificação de metanol pela metodologia proposta, possibilitando a comparação com aquela baseada na norma EN14110. Na Tabela 6, apresentam-se os níveis de concentração dos padrões, as áreas do pico de metanol encontrado utilizando a norma EN 14110 e as áreas do pico do nonanoato de metila obtido para os padrões derivatizados de acordo com a proposta deste trabalho. Nas Figuras 19 e 20, encontram-se as curvas analíticas obtidas para os dois casos, a partir dos dados da Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração dos padrões de metanol em biodiesel e áreas de resposta do detector de ionização em chama determinadas usando a norma EN 14110 e a metodologia desenvolvida

Concentração de metanol % (m/m)	Área (EN 14110)	Área (metodologia desenvolvida)
0,5093	3359780	214868
0,2948	-	124308
0,0998	693017	40504
0,0488	-	17257
0,0094	56579	5028
branco	-	1169

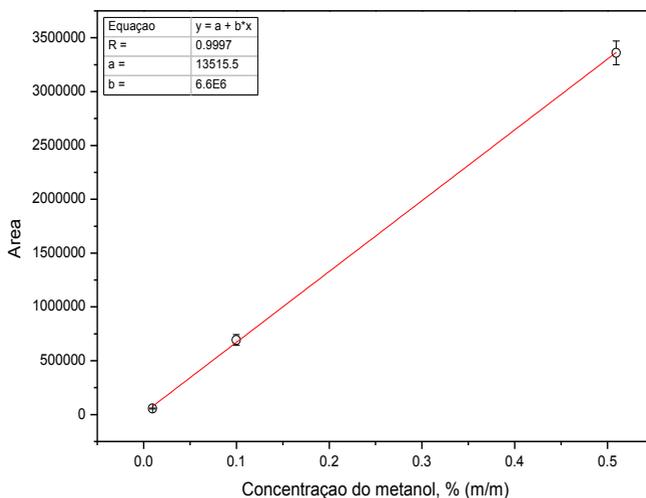


Figura 19– Curva analítica para quantificação do teor de metanol em biodiesel segundo a norma EN 14110

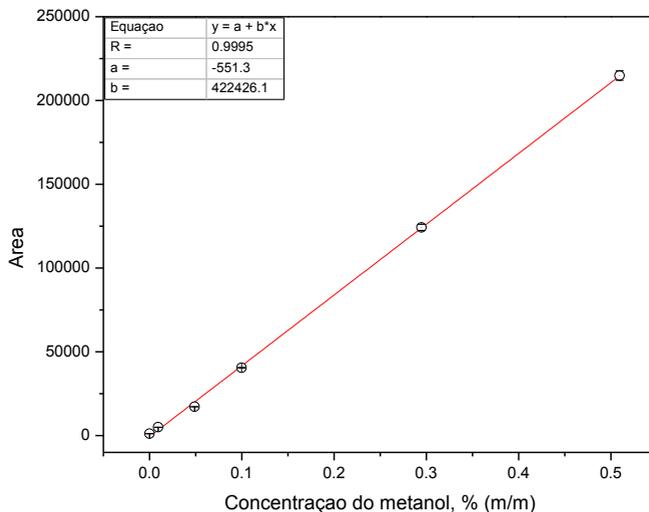


Figura 20 – Curva analítica para quantificação do teor de metanol em biodiesel pelo método de derivatização proposto

Em ambos os métodos os coeficientes de regressão encontrados foram superiores a 0,99, o que demonstra uma boa linearidade de resposta. Na curva analítica pela norma EN 14110 nota-se que o coeficiente angular é maior que no método proposto, evidenciando maior sensibilidade que a do método proposto. Entretanto, essa diferença de sensibilidade não afeta a quantificação do metanol.

5.3.3. Limite de detecção e quantificação

Para a determinação do limite de detecção, sete alíquotas de biodiesel foram secas à $110 \pm 10^\circ \text{C}$ por 1,5 h, derivatizadas com cloreto de nonanoíla em presença de piridina. Os estudos prosseguiram pela análise do sinal referente ao nonanoato de metila, cujos valores encontrados estão na Tabela 7. E a partir destes valores, o limite de detecção calculado foi 0,00015% (m/m).

Tabela 7 – Resultados obtidos para a determinação do limite de detecção da metodologia desenvolvida

Ensaio	Valor encontrado, % (m/m)
01	0,00014
02	0,00014
03	0,00014
04	0,00014
05	0,00014
06	0,00014
07	0,00013
Média	0,00014
Desvio padrão	0,000003
DPR (%)	2,73

O limite de quantificação está adotado como 0,01 % (m/m), referente ao valor do padrão de menor concentração da curva analítica na determinação do metanol. Cabe ressaltar que esse nível de concentração é 20 vezes menor do que o limite máximo de 0,20 % (m/m) para o teor de metanol em biodiesel, conforme a legislação vigente.

5.3.4. Tendência/recuperação

A exatidão mede o quanto o valor obtido na análise está próximo do valor verdadeiro presente na amostra e pode ser obtida a partir do emprego de materiais de referência certificados, pela comparação entre dois métodos, sendo um deles o oficial ou de referência, ou ainda, através da recuperação que consiste na adição de quantidades conhecidas do analito na matriz e a comparação com os resultados da quantificação.

Os valores de exatidão foram obtidos a partir de padrões preparados em três níveis de concentrações de metanol (baixo, médio e alto) de 0,0198; 0,2053 e 0,4458 % (m/m). Esses padrões também foram

analisados segundo a norma EN 14110 para realizar a comparação entre os métodos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados e comparação para recuperação da metodologia desenvolvida e da norma EN 14110

Experimento	Nível Baixo, 0,0198 % (m/m)		Nível Médio, 0,2053 % (m/m)		Nível Alto, 0,4458 % (m/m)	
	EN 14110	Método proposto	EN 14110	Método proposto	EN 14110	Método proposto
	1	0,01508	0,0219	0,18562	0,15963	0,39841
2	0,01494	0,02169	0,19163	0,15898	0,41971	0,42016
3	0,01549	0,02168	0,19468	0,15992	0,42215	0,42141
4	0,01595	0,02186	0,19929	0,16001	0,43683	0,42200
5	-	0,02179	-	0,15941	-	0,42340
6	-	0,02204	-	0,16093	-	0,42548
7	-	0,02211	-	0,16064	-	0,42627
Média	0,01537	0,02187	0,19281	0,15993	0,41928	0,42275
Desvio padrão	0,00045	0,00016	0,00573	0,00068	0,01583	0,00239
DPR (%)	2,96	0,75	2,97	0,43	3,78	0,56
Recuperação, %	78	111	94	78	94	95

Para o método oficial, a exatidão da determinação do metanol em biodiesel ficou entre 78 e 94 %, já para o método proposto a exatidão manteve-se entre 78 e 111 %. Em ambos os casos, a variação permaneceu dentro dos limites aceitáveis da exatidão em métodos cromatográficos, que segundo Ribani et al. está entre 70 e 120% de recuperação (RIBANI, et. al.,

2004), embora o documento de orientação para validação de métodos analíticos do INMETRO não estabeleça limites para este parâmetro.

5.3.5. Precisão

Os resultados obtidos no estudo de precisão do método estão apresentados na Tabela 9. A precisão do método foi avaliada a partir dos índices de repetitividade (r) e precisão intermediária (S_i). A repetitividade foi obtida em ensaios para três amostras de biodiesel com concentração de metanol nas faixas baixa, média e alta. As análises foram desenvolvidas pelo mesmo analista com mesmo equipamento em ensaios consecutivos nas mesmas condições ambientais. No caso da precisão intermediária, o estudo foi realizado nas mesmas condições por dois analistas. Os dados de repetitividade e precisão intermediária (analisada como reprodutibilidade) foram obtidos conforme descrito por Chui et. al (CHUI, 2009) sendo a repetitividade (r) dada pela Equação 11,

$$r = 2,8s_1 \quad (11)$$

onde s_1 representa o desvio-padrão dentro cada nível de concentração estudado. Para a precisão intermediária foi adotada a Equação 12,

$$S_i = 2,8 (s_1^2 + s_2^2)^{1/2} \quad (12)$$

onde s_2 representa o desvio-padrão entre todas as amostras analisadas pelos analistas A e B, sendo que o valor adotado refere-se ao maior valor de desvio-padrão obtido pelo analista B.

Analisando-se os parâmetros estatísticos apresentados na Tabela 9, verifica-se que a repetitividade e a precisão intermediária para o método

proposto possuem valores compatíveis com aqueles descritos na norma EN 14110. Além disso, a boa precisão dos resultados encontrados também é evidenciada já que o maior valor de desvio-padrão relativo encontrado foi de 0,75 % para os ensaios de repetitividade e de 3,6 % para o caso do estudo de precisão intermediária.

Tabela 9 – Resultados obtidos na determinação da precisão do método desenvolvido

Experimento	Nível baixo	Nível médio	Nível alto	Analista A	Analista B
1	0,02190	0,15963	0,42052	0,04590	0,05189
2	0,02169	0,15898	0,42016	0,04743	0,05497
3	0,02168	0,15992	0,42141	0,04792	0,05510
4	0,02186	0,16001	0,42200	0,04828	0,05572
5	0,02179	0,15941	0,42340	0,04905	0,05517
6	0,02204	0,16093	0,42548	0,04972	0,05827
7	0,02211	0,16064	0,42627	0,05027	0,05353
Parâmetros estatísticos					
Média	0,02187	0,15993	0,42275	0,04837	0,05495
Desvio padrão	0,00016	0,00068	0,00239	0,00148	0,00196
DPR (%)	0,75	0,43	0,56	3,1	3,6
r (repetitividade)	0,00046	0,00195	0,00611		0,00638
Si (precisão intermediária)	-	-	-		0,01414

5.3.6. Robustez

Os resultados obtidos no estudo da robustez na determinação simultânea do metanol e do teor de éster pelo método proposto estão mostrados na Tabela 10.

A amostra de referência “A” foi preparada utilizando 250,8 mg de biodiesel, 20µL de cloreto de nonanoíla e 10 minutos de reação. Além disso, para a análise desta amostra, a razão do *split* foi definida como 1:50. As condições de preparo das amostras B, C, D e E foram descritas anteriormente na Tabela 4 (pag. 36). Pela análise estatística descritiva, nota-se resultados homogêneos que são verificados pelos baixos valores de desvio-padrão e desvio padrão relativo que se mantiveram entre 0,02 e 5,95% respectivamente.

Tabela 10– Resultados obtidos para robustez em cinco experimentos distintos

	Experimentos				
	A	B	C	D	E
Média do teor de ésteres % (m/m)*	95,66	95,79	92,99	95,98	97,26
Desvio padrão	0,17	0,02	0,11	0,10	0,03
DPR %	0,18	0,02	0,11	0,10	0,03
Média do teor de metanol % (m/m)*	0,04788	0,05513	0,04839	0,03348	0,05504
Desvio padrão	0,00043	0,00006	0,00040	0,00199	0,0009
DPR %	0,89	0,10	0,82	5,95	0,17

*n = 3

Na comparação entre as amostras A e B, variando-se o volume de 20 para 25 μL de piridina, não foi verificada diferença estatística significativa, para o teor de ésteres, pelo teste t de student presumindo-se variâncias equivalentes com 95% de confiança e probabilidade de erro bicaudal (ou do Tipo I), pois o t calculado (1,28) foi menor que o t tabelado (2,78). Para a quantificação do metanol o valor de t calculado foi de 29,22 e o t tabelado 2,78 mostrando variação significativa entre as amostras.

Já na comparação entre A e C, variando-se o tempo de reação de 10 para 15 minutos em ambas as etapas da derivatização, foi observado o efeito inverso, pois para a quantificação do teor de ésteres o t calculado (23,11) foi maior que t tabelado (2,78). A diferença encontrada nesta comparação pode ter sido decorrente de erro no preparo da amostra, pois em outros experimentos o tempo passado além de 10 minutos não causaram efeitos nos resultados. Na quantificação do metanol o t calculado (1,52) foi menor que o t tabelado (2,78) mostrando que não houve variação significativa entre as amostras.

No caso da comparação entre A e D, onde a razão do *split* foi de 1:50 para 1:75, verifica-se que na quantificação do teor de ésteres o valor de t calculado é ligeiramente maior que t tabelado, sendo de 2,82 e 2,79, respectivamente. Na quantificação do metanol houve variação estatisticamente significativa entre os valores de t calculado e t tabelado, com valores de 23,11 e 2,79, respectivamente.

Na comparação entre A e E, onde a mudança foi dos analistas, nota-se variação estatisticamente significativa tanto na quantificação do teor de ésteres, quanto do metanol obtendo-se os valores de t calculado de 16,01 e 28,70 respectivamente, sendo o valor de t tabelado igual a 2,78.

Em alguns casos no estudo da robustez houve diferenças estatisticamente significativas tanto na quantificação do teor de éster, quanto na do metanol. Entretanto, as diferenças encontradas são menores do que as permitidas pela reprodutibilidade das metodologias normatizadas.

6. CONCLUSÕES

Primeiramente, as condições de reação foram otimizadas empregando-se piridina como catalisador, tempo total da reação de 20 minutos, adição de isopropanol para consumo do excesso de cloreto de nonanoíla. Durante o estudo da reação observou-se baixa solubilidade dos produtos em heptano, o que foi contornado com a substituição por diclorometano, sendo esta a única modificação em relação ao previsto na norma EN 14103:2003.

No estudo de validação, verificou-se que o método apresenta-se seletivo para metanol, conforme evidenciado pela identificação dos picos presentes no cromatograma, por meio da análise dos espectros de massas. Além disso, no estudo preliminar de interferência do etanol, por CG-DIC, verificou-se a separação entre nonanoato de metila e de etila. A linearidade da curva analítica foi excelente, com coeficiente de correlação de 0,999. Os limites de detecção e quantificação foram adotados como 0,01 % (m/m), referente ao padrão de menor concentração da curva analítica.

Os resultados do estudo de precisão e exatidão confirmam a validade da metodologia desenvolvida, já que os valores de repetitividade para os diferentes níveis de metanol se mostraram equivalentes aos obtidos para os ensaios pela norma EN 14110. Na avaliação preliminar da precisão intermediária entre dois analistas verificou-se que o maior desvio-padrão relativo foi de 3,6 %, dentro do aceitável para métodos analíticos baseados em cromatografia gasosa. Além disso, a recuperação manteve-se entre 78 e 111 %, também dentro do permitido para a técnica empregada.

Por outro lado, o estudo de robustez mostrou resultados contraditórios, para metanol e éster, dentro dos parâmetros avaliados. Embora o estudo de robustez indique que os parâmetros do método não possam ser modificados indiscriminadamente, isso não tem consequência significativa na validação da metodologia, pois os valores encontrados ainda

estão dentro das faixas de variação aceitáveis pelas metodologias normatizadas.

Desta forma, os resultados apresentados mostram que a metodologia inédita foi desenvolvida, validada e, portanto, pode ser empregada para a determinação simultânea dos teores de éster e metanol em biodiesel de óleo de soja.

7. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15764**: Biodiesel - Determinação da concentração de metanol e/ou etanol por cromatografia gasosa. Brasil, 2012a.

_____. **NBR 15343**: Biodiesel - Determinação de monoglicerídeos e diglicerídeos em biodiesel de mamona por cromatografia gasosa. Brasil 2012b.25

ALBANO, F. D. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais - Guia prático. **Rede Metrológica**, Porto Alegre 2009.

ALLINGER, N. L. **Química Orgânica 2**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1976. 984 p.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Portaria ANP nº 255, de 15 de setembro de 2003**. Brasil, 2003. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/>>. Acesso em: 25 abr. 2011.

_____. **Resolução ANP nº 42, de 24 de novembro de 2004**. Brasil, 2004. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/>>. Acesso em: 25 abr. 2011.

_____. **Resolução ANP nº 7, de 19 de março de 2008**. Brasil, 2008. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/>>. Acesso em: 25 abr. 2011.

_____. **Resolução ANP nº 14, de 11 de maio de 2012**. Brasil, 2012. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/>>. Acesso em: 06 jun. 2012.

ARAUJO, A. R. T. S. et al. Flow methodology for methanol determination in biodiesel exploiting membrane-based extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 2, p. 177-183, 2008. ISSN 0003-2670.

ARZAMENDI, G. et al. Monitoring of biodiesel production: Simultaneous analysis of the transesterification products using size-exclusion chromatography. **Chemical Engineering Journal**, v. 122, n. 1-2, p. 31-40, 2006. ISSN 1385-8947.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D6584**: Standard Test Method for Determination of Total Monoglyceride, Total Diglyceride, Total Triglyceride, and Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography. 2010.

_____. **ASTM D6751**: Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels. 2011.

ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070-2093, 2012. ISSN 1364-0321.

BOOG, J. H. F. et al. Determining the residual alcohol in biodiesel through its flash point. **Fuel**, v. 90, n. 2, p. 905-907, 2011. ISSN 0016-2361.

CANAKCI, M.; GERPEN, J. V. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, v. 44, n. 6, p. 1429-1436, 2003.

CAREY, F. A. **Organic Chemistry**. 4. Virgínia: McGraw-Hill, 2000. 1275 p.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry - Part B: Reactions and Syntesis**. Virgínia: Springer, 2007. 1346 p.

CHAVANNE, C. G., **Procedé de transformation d'huiles végétales em vue de leur utilisation comme carburants (Procedure for the determination of vegetable oils for their uses as fuels)**, Patente Benga nº 422,877 (31 de agosto de 1937). Chemical Abstract 32:4313, 1938.

CHUI, S. H.; BARROS, C. B. de; SILVA, T. D. Parâmetros r e R obtidos de programa interlaboratorial – Como usá-los. Nota Técnica, **Química Nova**, v.32, n. 8, p. 2209-2213, 2009.

CLARK, S. J. et al. Methyl and ethyl soybean esters as renewable fuels for diesel engines. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, n. 10, p. 1632-1638, 1984. ISSN 0003021X (ISSN).

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 3. Ed. Campinas: Editora Unicamp, 2006. 456 p. ISBN 85-268-0704-8.

COSTA NETO, P. R. 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. ISSN 0100-4042.

CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 127-134, 1999. ISSN 0003-2670.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. **EN - 14103**: Fat and oil derivatives. Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. 2003a.

_____. **EN 14105**: Fat and oil derivatives. Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents. 2003b.

_____. **EN - 14110**: Fat and oil derivatives. Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of methanol. 2003c.

_____. **EN - 14103**: Fat and oil derivatives. Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of methanol. 2012.

DROZD, J. **Chemical derivatization in gas chromatography**. 2 ed. Amsterdam: Elsevier, 1985. 246 p.

ENSSLIN, H. K.; KOVAR, K.-A.; MAURER, H. H. Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE, "Eve") and its metabolites in urine by gas chromatography - mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 683, n. 2, p. 189-197, 1996. ISSN 0378-4347.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods - A laboratory guide to validation and related topic**. 1 ed. Middlesex: Eurachem Guide, 1998. 75 p.

EURACHEM. **Determinando a incerteza de medição na medição analítica**. 2 ed. 2002.

FARIA, F. D. et al. Um Método Simples por Cromatografia Gasosa para Determinar o Teor de Álcool no Biodiesel. **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel**. Brasília, 2007.

FELIZARDO, P. et al. Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting methanol and water content in biodiesel. **Analytica Chimica Acta**, v. 595, n. 1-2, p. 107-113, 2007a. ISSN 0003-2670.

FELIZARDO, P. et al. Monitoring biodiesel fuel quality by near infrared spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 15, n. 2, p. 97-105, 2007b. ISSN 0967-0335.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. D. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja : taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, p. 19-23, 2005. ISSN 0100-4042.

FREEDMAN, B.; KWOLEK, W.; PRYDE, E. Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capillary gas chromatography 1. **Journal of the American Oil Chemists' Society**,v. 63, n. 10, p. 1370-1375, 1986. ISSN 0003-021X.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**,v. 61, n. 10, p. 1638-1643, 1984. ISSN 0003021X.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001. ISSN 1389-1723.

GELBARD, G. et al. ¹H nuclear magnetic resonance determination of the yield of the transesterification of rapeseed oil with methanol. **Journal of the American Oil Chemists Society**,v. 72, n. 10, p. 1239-1241, 1995. ISSN 0003-021X.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production.**Fuel Processing Technology**,v. 86, n. 10, p. 1097-1107, 2005. ISSN 0378-3820.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6 ed. Califórnia: LTC Editora, 2005. 876 p.

HEYDEN, Y. V. et al. Determination of system suitability limits with a robustness test. **Journal of Chromatography A**,v. 845, n. 1-2, p. 145-154, 1999. ISSN 0021-9673.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Vocabulário Internacional de Metrologia - Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Assossidados**. 1 ed. Rio de Janeiro, 2009. 78 p.

_____. **DOQ-CGCRE-008:Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 2011.

KNAPP, D. R. **Handbook of analytical derivatization reaction**. New York: John Wiley & Sons, 1979. 741 p.

KNOTHE, G. Rapid monitoring of transesterification and assessing biodiesel fuel quality by near-infrared spectroscopy using a fiber-optic probe. **Journal of the American Oil Chemists' Society**,v. 76, n. 7, p. 795-800, 1999. ISSN 0003-021X.

KNOTHE, G. Analyzing biodiesel: Standards and other methods. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 83, n. 10, p. 823-833, 2006. ISSN 0003-021X.

KNOTHE, G. et al. **Manual de Biodiesel**. 1 ed. São Paulo: Editora Blucher, 2006.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62 p.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. D. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, p. 1596-1608, 2009. ISSN 0100-4042.

MA, F.; CLEMENTS, L. D.; HANNA, M. A. Biodiesel Fuel from Animal Fat. Ancillary Studies on Transesterification of Beef Tallow†. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 37, n. 9, p. 3768-3771, 1998. ISSN 0888-5885.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 1992. 1495 p.

MARQUES, M. V. et al. Determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel metílico de soja por cromatografia gasosa utilizando oleato de etila como padrão interno. **Química Nova**, v. 33, p. 978-980, 2010. ISSN 0100-4042.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic Gas Chromatography - Techniques in Analytical Chemistry**. 1 ed. New York: J&W Scientific, 1997. 104 p.

MITTELBACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils, V [1]: Gas chromatographic determination of free glycerol in transesterified vegetable oils. **Chromatographia**, v. 37, n. 11, p. 623-626, 1993. ISSN 0009-5893.

MITTELBACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: Specifications and quality control of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 56, n. 1, p. 7-11, 1996a. ISSN 0960-8524.

MITTELBACH, M.; ROTH, G.; BERGMANN, A. Simultaneous gas chromatographic determination of methanol and free glycerol in biodiesel. **Chromatographia**, v. 42, n. 7, p. 431-434, 1996b. ISSN 0009-5893.

MONTEIRO, M. R. et al. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta**, v. 77, n. 2, p. 593-605, 2008. ISSN 0039-9140.

MORRINSON, R. T.; BOYD, R. N. **Química Orgânica**. 13 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. 1349 p.

NETO, J. N. N. **Informativo do Comitê Brasileiro do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente**. Instituto Brasil PNUMA, n. 81, 2005.

OTERA, J. Transesterification. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 4, p. 1449-1470, 1993. ISSN 0009-2665.

PARASCHIVESCU, M. C. et al. Determination of methanol in biodiesel by headspace solid phase microextraction. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5901-5905, 2008. ISSN 0960-8524.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008. ISSN 0100-4042.

PLANK, C.; LORBEER, E. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 697, n. 1-2, p. 461-468, 1995. ISSN 0021-9673.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004. ISSN 0100-4042.

SAKA, S.; KUSDIANA, D. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. **Fuel**, v. 80, n. 2, p. 225-231, 2001. ISSN 0016-2361.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007. 543 p.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, n. 2, p. 111-133, 2000. ISSN 1364-0321.

TAT, M. E.; GERPEN, J. H. V. The kinematic viscosity of biodiesel and its blends with diesel fuel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 12, p. 1511-1513, 1999.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TRATHNIGG, B.; MITTELBACH, M. Analysis of Triglyceride Methanolysis Mixtures Using Isocratic HPLC With Density Detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, n. 1, p. 95 - 105, 1990. ISSN 0148-3919.

WAWRZYNIAK, R.; WASIAK, W.; FRĄCKOWIAK, M. Determination of methyl esters in diesel oils by gas chromatography - Validation of the method. **Chemical Papers**, v. 59, n. 6 B, p. 449-452, 2005. ISSN 03666352.

WIXOM, R. L.; GEHRKE, C. W. **Chromatography - A Science of Discovery**. 1. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010. 436 p.

ANEXOS

ANEXO I – Especificação do biodiesel de acordo com o regulamento técnico ANP nº 4/2012 parte integrante da resolução ANP nº 14, de 11 de maio de 2012(ANP, 2012)

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	Límpido e isento de impurezas	-	-	-
Massa específica a 20°C	kg/m ³	850 a 900	7148	1298	3675
			14065	4052	12185
Viscosidade Cinemática a 40°C,	mm ² /s	3,0 - 6,0	10441	445	3104
Teor de água, máx.	mg/kg	380	-	6304	12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	12662
Ponto de fulgor, mín.	°C	100	14598	93	3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	14103
Resíduo de carbono, máx.	% massa	0,050	15586	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	15867	5453	20846
					20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15553		14108
			15554		14109
			15555	-	14538
			15556		-
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553		14538
			15556	-	
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	14107

Corrosividade ao Cu, 3h a 50°C		1	14359	130	2160
Número de Cetano	-	Anotar	-	613 6890	5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19	14747	6371	116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,5	14448	664	14104
Glicerina livre, máx.	%massa	0,02	15341 15771	6584	14105 14106
Glicerina total, máx.	%massa	0,25	15344 15908	6584	14105
Monoacilglicerol	% massa	0,80	15342 15344 15908	6584	14105
Diacilglicerol	% massa	0,20	15344 15908	6584	14105
Triacilglicerol	% massa	0,20	15342 15344 15908	6584	14105
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	14110
Índice de Iodo	g/100g	Anotar	-	-	14111
Estabilidade à oxidação a 110°C,mín	h	6	-	-	14112 15751

ANEXO II - Características do biodiesel utilizado no experimento.

Característica	Resultado	Método
Aspecto	Límpido e isento de impurezas, 19,4 °C	-
Teor de água, mg/kg	244	ASTM D6304/2007
Teor de ésteres, % massa	97,4	EN 14103/2003
Glicerina livre, % massa	0,01	EN 14105/2003
Glicerina total, % massa	0,31	EN 14105/2003
Monoacilglicerol, % massa	1,07	EN 14105/2003
Diacilglicerol, % massa	0,22	EN 14105/2003
Triacilglicerol, % massa	0,00	EN 14105/2003
Índice de acidez, mg KOH/g	0,09	ASTM D664 Método B/2011
Cinzas sulfatadas, % massa	0,001	NBR 6204/08
Resíduo de Carbono, % massa	0,000	ASTM 4530/2003
Viscosidade cinemática a 40 °C, mm²/s	4,956	ASTM D445/2011
Metanol, % massa	0,05	EN 14110/2003