

ANTONIO CARLOS BERGAMASCHI TERCINI

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA GASOSA ULTRARRÁPIDA
PARA QUANTIFICAÇÃO DO TEOR TOTAL DE ÉSTERES EM
AMOSTRAS DE BIODIESEL

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de mestre em Química.

Orientador:
Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira

Araraquara
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

T315d Tercini, Antonio Carlos Bergamaschi
Desenvolvimento e validação de método analítico
empregando cromatografia gasosa ultrarrápida para
quantificação do teor total de ésteres em amostras de
biodiesel / Antonio Carlos Bergamaschi Tercini. –
Araraquara : [s.n], 2014
87 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: José Eduardo de Oliveira

1. Química analítica. 2. Cromatografia a gás. 3. Biodiesel.
4. Controle de qualidade. I. Título.

ANTONIO CARLOS BERGAMASCHI TERCINI

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Química.

Araraquara, 11 de julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA (Orientador)
Instituto de Química, UNESP – Araraquara - SP



Prof. Dr. DANILO LUIZ FLUMIGNAN
Instituto Federal de São Paulo, IFSP – Matão - SP



Dr. CARLOS EDUARDO DOMINGUES NAZARIO
Instituto de Química de São Carlos, USP – São Carlos - SP

AGRADECIMENTOS

Ao escrever esta dissertação tive a colaboração de muitas pessoas. Durante este período as contribuições foram tão valiosas que todos os que me auxiliaram podem ser, de alguma forma, considerados como autores deste trabalho.

Começo agradecendo ao professor José Eduardo de Oliveira, a pessoa que inspirou este trabalho e o confiou a mim. Também sou grato aos Mestres e Doutores Rafael Rodrigues Hatanaka, Rodrigo Sequinel e Danilo Luiz Flumignan, e todos os docentes do Instituto de Química pela dedicação na transmissão do conhecimento e por despertar espírito crítico e a busca pelo saber em seus alunos.

Ao Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados (Cempeq), que forneceu um ambiente ideal para o desenvolvimento acadêmico, além da oportunidade de conviver com pessoas muito talentosas.

Aos colegas de trabalho Murilo Pinesi, Maurílio Nespeca, Evellin Silvério, Maria Luiza Morelli Carrascosa, Karol Silva e todos outros colaboradores do Cempeq.

À família que representa minhas raízes: meus pais Donizeti e Maristela, por uma vida de dedicação e amor, irmãos João Rafael e Marcela, por me suportarem a cada dia, a avó Nelcy, sempre me enchendo de carinho, e ao avô João (em memória). Também aos amigos que sempre me mantiveram motivado.

E finalmente, ao Instituto de Química, a Fundunesp; e todas outras instituições que viabilizaram esta dissertação.

“Ao infinito e além.”

(Buzz Light-year)

RESUMO

Com a busca por novas fontes de energia renovável, o biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira, e com isso a ANP assumiu a atribuição de regular e fiscalizar a qualidade do biodiesel.

Quimicamente, o biodiesel é uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos, derivados de óleos vegetais e gorduras animais, geralmente produzidos por uma reação de transesterificação, em que a matéria prima reage com um álcool, na presença de um catalisador. É a principal alternativa ao diesel fóssil e as principais vantagens de seu uso é o fato de que é um recurso renovável não tóxico, e que diminui as emissões de gases poluentes quando adicionado ao diesel, tornando-o importante não apenas do ponto de vista energético, mas também ambiental.

A ANP estabelece 25 parâmetros que devem ser analisados para certificar a qualidade do biodiesel, e os métodos analíticos que devem ser usados para sua determinação. Dentre esses, o teor total de ésteres pode ser considerado o principal parâmetro, e os métodos oficiais de análise são por cromatografia gasosa convencional e apresentam por volta de 31 minutos de corrida cromatográfica.

Este trabalho relata o uso de cromatografia gasosa ultra-rápida para determinar o teor total de ésteres do biodiesel, diminuindo o tempo de análise em 15 vezes (1,5 min).

A diferença entre a CG-UR e a CG-C está no menor comprimento da coluna capilar, de 2 a 10m, diâmetro interno reduzido, entre 0,05 e 0,10mm, aquecimento resistivo da coluna, ao invés do uso do forno convencional e taxa elevada de aquecimento da coluna.

Através da elaboração de uma curva analítica e posterior validação foi possível quantificar o teor total de ésteres em biodiesel de soja em um curto intervalo de tempo, com a mesma confiabilidade.

Palavras chave: Biodiesel, Cromatografia Gasosa Ultrarrápida, Validação de Métodos.

ABSTRACT

With the search for new sources of renewable energy, biodiesel was introduced in the Brazilian energy matrix, and the ANP took the assignment to regulate and supervise the quality of biodiesel .

Chemically, Biodiesel is a mixture of a fatty acids methyl esters, derived from vegetable oils and animal fats, usually produced by a transesterification reaction in which the feedstock is reacted with an alcohol in the presence of a catalyst. It is the main alternative to fossil diesel and the main advantages of its use is the fact that it is a non-toxic renewable resource, and reduces greenhouse gas emissions when added to diesel, making it important not only from the point of view of energy but also environmental .

The ANP provides 25 parameters that must be analyzed to ensure the quality of biodiesel and analytical methods to be used for its determination. Among these , the total ester content can be considered the main parameter and the official methods of analysis is by conventional gas chromatography and feature around 31 minutes into the chromatographic run .

This paper reports the use of ultra -fast gas chromatography (GC- UF) to determine the total ester content of biodiesel , reducing analysis time by 15 times (1.5 min).

The difference between the UF with GC- GC- C is the smaller capillary column length of 2 to 10m, reduced internal diameter between 0.05 and 0.10 mm , resistive heating of the column, rather than the use of the oven conventional and high rate of heating of the column.

Through the development of an analytic curve and subsequent validation was possible to quantify the total ester content in biodiesel from soybean in a short period of time, with the same reliability .

Key Words: Biodiesel, Ultra-Fast Gas Chromatography, Validation Methods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Reação de transesterificação	16
Figura 2 -	Mecanismo da reação de transesterificação por catálise básica	17
Figura 3 -	Esquema de uma separação cromatográfica	24
Figura 4 -	Representação de um pico cromatográfico comum	25
Figura 5 -	Representação gráfica de t_R , t'_R e t_M	26
Figura 6 -	Representação gráfica do fator de separação α	27
Figura 7 -	Representação esquemática da Difusão de Eddy	29
Figura 8 -	Representação esquemática da Difusão Longitudinal	29
Figura 9 -	Representação esquemática dos Efeitos de Transferência de Massas	29
Figura 10 -	Representação gráfica da equação de van Deemter	30
Figura 11 -	Sistema de um cromatógrafo a gás básico	32
Figura 12 -	Secção transversal de um injetor Split	34
Figura 13 -	Secção transversal de um injetor splitless	35
Figura 14 -	Tipos de coluna para Cromatografia Gasosa: (a) coluna empacotada; (b) WCOT; (c) SCOT; (d) PLOT	37
Figura 15 -	secção transversal de um típico detector FID	39
Figura 16 -	Módulo ultrarrápido (“gaiola”) usado em CG-UR. (A) Sistema dedicado de aquecimento resistivo da coluna (Thermo Fisher Scientific Inc.®). (B) Detalhe do revestimento da coluna capilar: 1- elemento aquecedor, 2-coluna capilar, 3-fibra cerâmica, 4-sensor de temperatura	47
Figura 17 -	Módulo ultrarrápido montado no cromatógrafo a gás utilizado	57
Figura 18 -	Perfil cromatográfico obtido pelo Método 1 para mistura de ésteres por CG-UR	60
Figura 19 -	Perfil cromatográfico obtido pelo Método 2 para mistura de ésteres por CG-UR	62
Figura 20 -	Perfil cromatográfico obtido pelo Método 3 para uma mistura de ésteres (C14 e C18) por CG-UR	63

Figura 21 -	Perfil cromatográfico obtido pelo Método 4 para uma mistura de ésteres (C14 e C18) por CG-UR	64
Figura 22 -	Perfil cromatográfico de mistura de ésteres obtido por CG-UR. injetor Split / Splitless e detector FID mantidos a 250°C, gás de arraste hidrogênio com um fluxo constante de 1,2 mL min ⁻¹ . A corrida cromatográfica foi realizada com temperatura programada de 100°C, mantendo por 0,40 min, até 250°C, mantendo por 1,10 min, com uma taxa de aquecimento de 250°C min ⁻¹ . O volume de amostra injetado foi de 0,1 µL com taxa de Split de 1:400 (método 5)	65
Figura 23 -	Perfil cromatográfico obtido pelo Método 6 para mistura de ésteres por CG-UR	66
Figura 24 -	Cromatograma obtido para uma amostra de biodiesel de soja	67
Figura 25 -	Cromatograma obtido para uma amostra de biodiesel comercial	68
Figura 26 -	Curva analítica construída a partir dos dados contidos nas tabelas Tabela 10 e Tabela 11	71
Figura 27 -	Gráfico de resíduos da curva analítica	72
Figura 28 -	Gráfico de Pareto, com intervalo de confiança de 95%, para a avaliação da influência dos parâmetros Ti, R1, R2 e F	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros de Qualidade do Biodiesel, Resolução ANP nº 14/2012	19
Tabela 2 -	Ponto de Entupimento de Filtro a Frio	22
Tabela 3 -	Gases de arraste ideais para cada detector	32
Tabela 4 -	Número Efetivo de Carbonos (relativos ao heptano)	40
Tabela 5 -	Substâncias que dão baixas ou nenhuma resposta no FID	40
Tabela 6 -	Principais parâmetros para a caracterização das diversas modalidades de cromatografia gasosa	43
Tabela 7 -	Massas teóricas utilizadas no preparo das soluções padrão de octadecanoato de metila	59
Tabela 8 -	Composição química em ácidos graxos do óleo de soja.	61
Tabela 9 -	Variações no fluxo do gás de arraste e na razão de Split para os métodos 2, 3 e 4	62
Tabela 10 -	Curva analítica teor total de ésteres (C18)	69
Tabela 11 -	Área dos pontos da curva analítica	70
Tabela 12 -	Teste de Fisher	73
Tabela 13 -	Repetitividade do método	74
Tabela 14 -	Precisão intermediária do método	75
Tabela 15 -	Planejamento Fatorial em dois níveis variando quatro parâmetros	77
Tabela 16 -	Preparação das amostras para avaliação da Recuperação	78
Tabela 17 -	Concentração medida para amostra com acréscimos de C18	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABNT** – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ANP** – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASTM** – *American Society for Testing and Materials*
- CEMPEQC** – Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados
- CEN** – Comitê Europeu de Normalização
- CG** – Cromatografia Gasosa
- CG-C** – Cromatografia Gasosa Convencional
- CG-CC** – Cromatografia Gasosa com Coluna Curta
- CGL** – Cromatografia gás-líquido
- CG-MR** – Cromatografia Gasosa Muito Rápida
- CG-R** – Cromatografia Gasosa Rápida
- CGS** – Cromatografia gás-sólido
- CG-UR** – Cromatografia Gasosa Ultrarrápida
- CRM** – Material de Referência Certificado
- ECD** – *Electron Capture Detector*
- EN** – Norma Européia
- FAMEs** – *Fatty Acid Methyl Esters*
- FID** – Detector de ionização de chama
- ICH** – *International Conference on Harmonisation*
- INMETRO** – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- IPT** – Instituto de Pesquisas Tecnológicas
- ISO** – *International Organization for Standardization*
- MAPA** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- NBR** – Norma Brasileira
- NEC** – Número Efetivo de Carbonos
- PLOT** – *Porous-Layer Open Tubular*
- PTV** – *Programmed Temperature Vaporising injector*
- RSD** – Desvio Padrão Relativo
- SCOT** – *Support Coated Open Tubular*
- UFM** – Módulo Ultrarrápido

UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

WCOT – *Wall Bonded Open Tube*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Histórico do trabalho realizado	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Biodiesel	17
3.2	Parâmetros de Qualidade do Biodiesel.....	19
3.3	Teor de Éster	23
3.4	Cromatografia em Fase Gasosa	24
3.4.1	Teoria Básica	25
3.4.2	Instrumentação	32
3.4.3	Gás de Arraste.....	33
3.4.4	Injetores	34
3.4.5	Coluna	36
3.4.6	Detectores.....	39
3.5	Cromatografia Gasosa Ultrarrápida	42
3.5.1	Evolução	42
3.5.2	Definição	43
3.5.3	Principais parâmetros envolvidos na redução do tempo de análise	45
3.5.4	Instrumentação da CG-UR.....	46
3.5.5	Amostradores e Injetores e Detectores.....	47
3.5.6	Coluna Cromatográfica.....	47
3.5.7	Sistema de Aquecimento da Coluna	47
3.5.8	Determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos por CG-UR	48
3.6	Validação de métodos cromatográficos	49
3.6.1	Conceitos básicos do processo de validação	50
3.6.2	Parâmetros analíticos para validação de métodos	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1	Reagentes e Materiais	57

4.2	Equipamentos	57
4.3	Análises Cromatográficas	58
4.4	Preparação das Amostras	59
4.5	Preparação da Curva Analítica	59
4.6	Expressão dos Resultados	60
5	RESULTADOS	61
5.1	Desenvolvimento do Método Cromatográfico	61
5.2	Construção da curva Analítica	69
5.3	Validação do Método	73
5.3.1	Seletividade	73
5.3.2	Linearidade	73
5.4	Precisão	74
5.4.1	Repetitividade	75
5.4.2	Precisão Intermediária	76
5.5	Exatidão	76
5.6	Robustez	78
5.7	Recuperação	79
6	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS		

1 INTRODUÇÃO

Junto da crescente demanda de combustíveis automotivos surgiram problemas econômicos e de aspectos ambientais, além da possível escassez dos combustíveis fósseis, que levaram as autoridades do país a buscar rotas alternativas de produção de energia que substituam a queima destes combustíveis. Neste contexto surge a concepção dos combustíveis renováveis: combustíveis alternativos, tecnicamente plausíveis, economicamente competitivos, prontamente disponíveis e aceitáveis do ponto de vista ambiental. Dentre eles os chamados biocombustíveis, em especial: o biodiesel, cuja participação na matriz energética nacional vem sendo gradualmente aumentada.^{1, 2}

Contudo, a ideia do uso de biodiesel no Brasil não é recente. Já em 1982 foram realizados diversos testes em colaboração com a indústria automobilística. Dentre os vários combustíveis testados vale ressaltar o biodiesel etílico de soja puro e a mistura de 30% de biodiesel etílico de soja e 70% de óleo diesel. Apesar dos resultados se apresentarem promissores, o alto custo do produto, impediu a implementação do seu uso comercial na época.³

Posteriormente, com a elevação dos preços dos derivados de petróleo e a crescente preocupação ambiental, o biodiesel passou a ser visto como uma alternativa economicamente viável e prontamente disponível, uma vez que, pode ser obtido a partir de uma grande variedade de fontes vegetais, gordura animal e OGR (óleos e gorduras residuais).¹

Sob o ponto de vista econômico, a produção e uso do biodiesel causa a diminuição da dependência do diesel importado, além de outros efeitos indiretos de sua produção e uso, como o incremento a economias locais e regionais, tanto na etapa agrícola como na indústria de bens e serviços. Com a ampliação do mercado do biodiesel, milhares de famílias brasileiras são beneficiadas, com o aumento de renda proveniente do cultivo e comercialização das plantas oleaginosas utilizadas na produção do biodiesel.⁴ A produção do biodiesel é vantajosa em função da possibilidade do cultivo de oleaginosas sem afetar a produção e oferta de alimentos. O que é assegurado, em parte, pela dimensão continental do território.^{4, 5}

Sob o ponto de vista ambiental, a aplicação do uso do biodiesel acarreta a diminuição das principais emissões veiculares, como a liberação de menos compostos contendo enxofre e a não emissão de fumaça preta nem odores

desagradáveis pela exaustão dos motores. Possibilita, também, a utilização dos créditos de carbono vinculados ao mecanismo limpo de produção.^{6, 7, 8}

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, produzindo 6887 milhões de litros nesse ano de 2014, e com capacidade de produção de 8539 milhões de litros.⁹ Vários fatores são altamente favoráveis ao cultivo de diferentes fontes vegetais para produção de biodiesel, tais como clima, vocação agrícola e a disponibilidade de terras adequadas à agricultura. O avanço na produção de biodiesel torna o Brasil um país estrategicamente importante para o mundo inteiro, devido ao esgotamento das reservas energéticas fósseis, já conhecidas.⁶ Pioneiro mundial no uso de biocombustíveis, o Brasil alcançou uma posição almejada por muitos países que buscam fontes renováveis de energia, como alternativas estratégicas ao petróleo.⁵

Com a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira pela lei nº 11.097, em 13 de janeiro de 2005, a ANP assumiu a atribuição de regular e fiscalizar as atividades relativas à produção, controle de qualidade, distribuição e comercialização do biodiesel. A regulamentação que especifica a comercialização do biodiesel e define os parâmetros físico-químicos para seu controle de qualidade no Brasil é a Resolução ANP nº 14/12.¹⁰

A determinação das características do biodiesel deve ser realizada mediante o emprego de normas aplicáveis da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), normas internacionais *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *International Organization for Standardization* (ISO) e *Comité Européen de Normalisation* (CEN).¹⁰

Dentre os vários parâmetros que devem atestar a qualidade do biodiesel comercializado no país, pode se dizer que a determinação do teor total de ésteres é o principal deles. A avaliação do teor de éster no biodiesel, segundo resolução da ANP, é realizada de acordo com a norma técnica internacional EN/ISO 14103, ou a norma técnica nacional ABNT NBR 15764.

Ambas as normas empregam como técnica analítica a cromatografia em fase gasosa convencional e são amplamente utilizadas no controle de qualidade do biodiesel comercializado no país. O tempo de corrida cromatográfica necessário para analisar uma amostra é de aproximadamente 30 minutos. Com o mercado do biodiesel crescendo, com o concomitante aumento na demanda por análises de qualidade, torna-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias que

proporcionem aos laboratórios a mesma confiabilidade em menor tempo, permitindo assim um maior número de análises em função do tempo, aumentando a produtividade, gerando maior tranquilidade no cumprimento dos prazos, e maior lucro.

1.1 Histórico do trabalho realizado

O objetivo inicial desta dissertação era utilizar a CG-UR para obtenção de *fingerprint*s analíticos para realizar correlações quimiométricas que permitissem a previsão dos parâmetros físico-químicos em amostras de biodiesel (dando assim continuidade à linha de pesquisa do grupo Combustíveis e Biocombustíveis do Cempec).

No entanto após um ano de trabalho, coletando inúmeras amostras de biodiesel de soja comercial e realizando análises de seus principais parâmetros físico-químicos, paralelamente ao desenvolvimento do método cromatográfico não foi possível desenvolver um modelo quimiométrico satisfatório, que conseguisse prever um ou mais parâmetros físico-químicos do biodiesel. Os parâmetros determinados foram: Viscosidade Cinemática e Massa Específica (Densímetro Anton-Paar DMA4500 - ASTM D4052), Teor de Água (Titulador Coulométrico Karl Fischer Metrohm 831 - ASTM D6304), Índices de Acidez e de Iodo (Titulador Potenciométrico Kyoto KEM AT 500N - EN 14111 e ASTM D664), Ponto de Entupimento de Filtro a Frio (Analisador de Ponto de Entupimento de Filtro a Frio Tanaka AFP-102 - ASTM D6371) e Estabilidade à Oxidação a 110°C (Analisador de Estabilidade Oxidativa Rancimat Metrohm 743 - EN 14112).

Nesse momento o método por CG-UR, que era um meio para atingir o objetivo final do trabalho, passou a ser o foco, devido ao seu caráter inovador por permitir a separação dos ésteres do biodiesel em apenas alguns minutos, e permitindo a quantificação total do teor de ésteres através de uma curva analítica.

Com isso foi estabelecido como novo objetivo, o desenvolvimento e a validação do método cromatográfico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método por cromatografia gasosa ultrarrápida (CG-UR) para a quantificação do teor total de ésteres em amostras de biodiesel comercial.

2.2 Objetivos Específicos

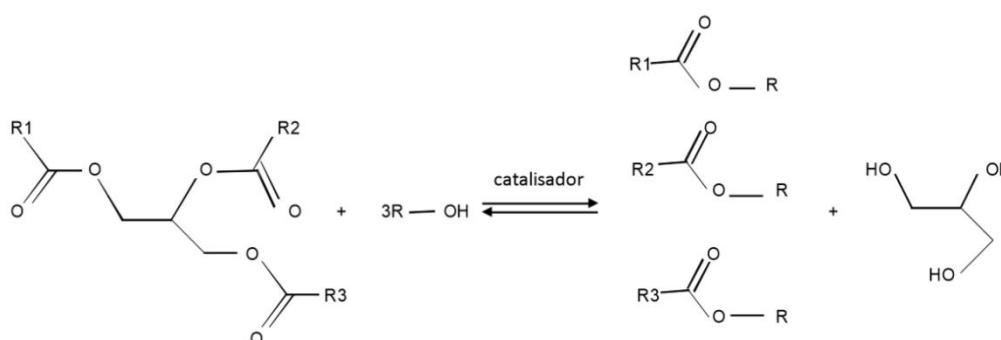
- Desenvolver método por GC-UR capaz de separar uma mistura de padrões de ésteres metílicos.
- Utilizar curva analítica externa para realizar a quantificação do teor total de ésteres.
- Validar o método desenvolvido utilizando as seguintes figuras de mérito: Precisão, Exatidão e Robustez.
- Aplicar o método na separação e quantificação dos ésteres constituintes de diferentes amostras de biodiesel comercial brasileiro.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biodiesel

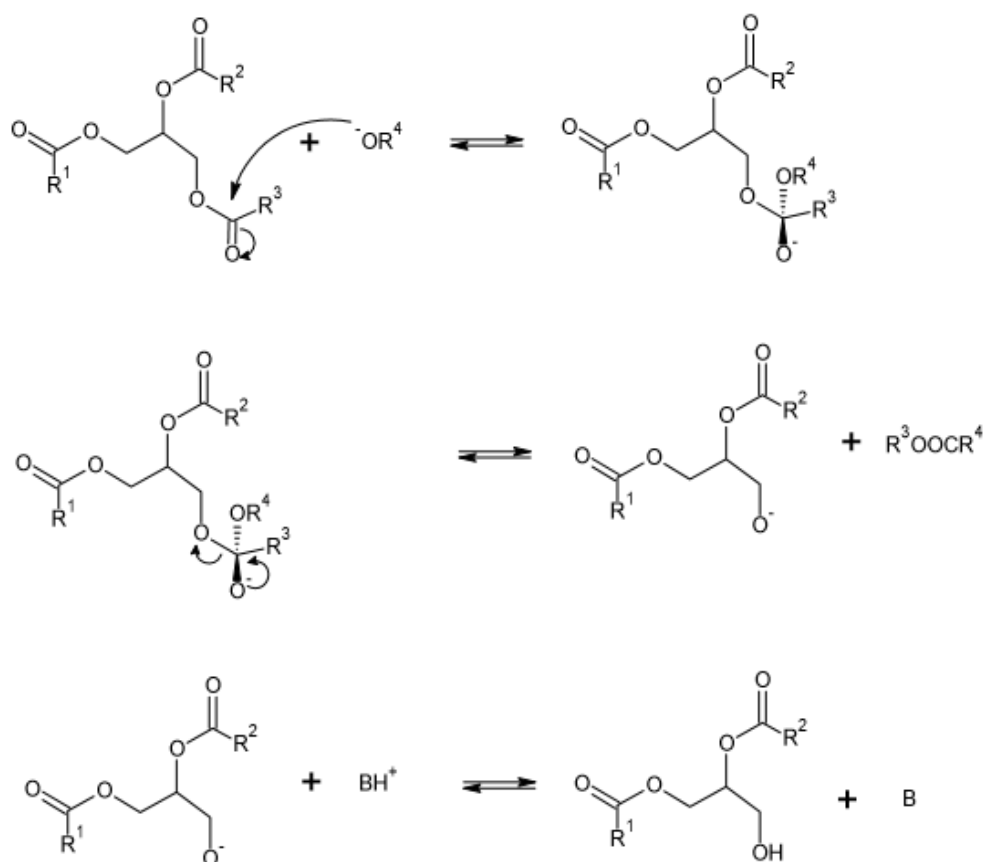
O biodiesel é definido como uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos resultante da transformação química de triacilglicerídeos (óleos e gorduras). Pode ser obtido através de diferentes processos, como, esterificação, hidroesterificação e transesterificação. A obtenção de biodiesel através da esterificação é catalisada por ácido. A vantagem de se utilizar a reação de esterificação é que a eventual alta acidez do óleo não é uma limitação para a reação. Todavia a reação torna-se complexa uma vez que necessita de mais etapas no processo industrial em relação à transesterificação.¹¹ A hidroesterificação consiste em utilizar diretamente os ácidos graxos. Porém apresenta como desvantagem o alto custo energético, que pode ser justificado pela etapa de hidrólise. A tecnologia para produção de biodiesel predominante no mundo é o processo de transesterificação. Na transesterificação os triacilglicerídeos reagem com um álcool, na presença de um catalisador ácido forte ou base forte, produzindo, majoritariamente, uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos e glicerol (co-produto).^{12, 13} A reação de transesterificação consiste na substituição no grupo acila, na presença de etanol ou metanol, dando origem a ésteres metílicos ou etílicos e glicerol, e está esquematizada pela Figura 1. A molécula de óleo vegetal é formada por três grupos acila ligados ao íon gliceróxido (triacilglicerídeo). A Figura 2 mostra o mecanismo para a reação de transesterificação.¹⁴

Figura 1 - Reação de transesterificação.



Fonte: GASPARINI, F., 2008.¹⁴

Figura 2 - Mecanismo da reação de transesterificação por catálise básica.



Fonte: GASPARINI, F., 2008.¹⁴

Dentre os catalisadores mais utilizados na reação de transesterificação estão o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e seus alcóxidos correspondentes, também são utilizados catalisadores ácidos, como ácido sulfúrico e ácido clorídrico. Catalisadores alcalinos propiciam processos mais rápidos que os catalisadores ácidos, e por esse motivo são normalmente mais empregados nas reações de transesterificação.^{15, 16} O álcool mais utilizado na transesterificação é o metanol devido à simplicidade do processo, e vantagens como: tempo de reação reduzido (devido ao menor tamanho da molécula), boa separação entre a fase glicerol e a fase dos ésteres metílicos e alta conversão dos triacilglicerídeos em ésteres metílicos, além do menor preço em relação ao etanol.⁷ Entretanto, o metanol apresenta desvantagem devido a sua alta toxicidade. O uso de etanol torna-se vantajoso sob o ponto de vista ambiental, porém, estudos mais elaborados utilizando etanol na produção de biodiesel ainda são poucos, se levarmos em conta a grande

potencialidade deste álcool e a diversidade de fontes de triacilglicerídeos disponíveis no Brasil.¹⁴

Como apresentado anteriormente, o biodiesel é o resultado da transformação química de óleos e gorduras através da reação de transesterificação. Após a reação o produto final, além dos ésteres metílicos ou etílicos, pode conter teores variados de mono-, di- e triacilglicerídeos (glicerídeos que não reagiram completamente), ácidos graxos livres, glicerol, álcool e catalisadores. O glicerol é obtido como co-produto da reação e é separado da fase proveniente dos ésteres pela diferença de polaridade, assim como grande parte do álcool remanescente por decantação. Uma das maneiras de retirar o glicerol, o álcool e o catalisador remanescentes no biodiesel, é através de sucessivas lavagens com água (chamada de fase de polimento). O teor de água residual por sua vez é eliminado no processo de secagem do biodiesel. Mesmo após os processos de lavagem e secagem pequenas quantidades de todas as substâncias acima citadas podem permanecer em pequenas quantidades no produto final, e por esse motivo, seus limites máximos devem ser controlados, sendo monitorados de acordo com os ensaios estabelecidos na Resolução ANP nº 14/12.¹⁰

3.2 Parâmetros de Qualidade do Biodiesel

A Resolução ANP nº 14/12 contempla uma série de outros parâmetros (Tabela 1) que devem ser monitorados para garantir a qualidade do biodiesel.

Os objetivos de realizar o controle da qualidade do biodiesel incluem: evitar fraudes, como adição ilegal de substâncias de baixo custo ao combustível; assegurar direitos dos consumidores e; manter a garantia dos fabricantes de automóveis, visto que combustíveis fora das especificações e/ou adulterados causam danos em partes importantes do motor. Além da adulteração, a qualidade do biodiesel pode sofrer variações devido à presença de contaminantes oriundos da matéria prima, do processo de produção ou formados durante a estocagem do biodiesel.¹⁴

Tabela 1 Parâmetros de Qualidade do Biodiesel, Resolução ANP nº 14/2012.

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m³	850 a 900	7148 14065	1298 4052	3675 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm²/s	3,0 a 6,0	10441	445	3104
Teor de água, máx.	mg/kg	(2)	-	6304	12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	12662 15995
Ponto de fulgor, mín. (3)	°C	100	14598	93	3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	14103
Resíduo de carbono, máx. (4)	% massa	0,05	15586	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,02	6294	874	3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	15867	5453	20846 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553	-	14108 14109 14538

			15556		
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	2160
Número Cetano (5)	-	Anotar	-	613 6890 (6)	5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	-7	14747	6371	116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,5	14448	664	14104 (8)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 (8) 15771	6584 (8)	14105 (8) 14106 (8)
Glicerol total, máx. (9)	% massa	0,25	15344 15908	6584 (8)	14105 (8)
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,8	15342 (8) 15344 15908	6584 (8)	14105 (8)
Diacilglicerol, max.	% massa	0,2	15342 (8) 15344 15908	6584 (8)	14105 (8)
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,2	15342 (8) 15344 15908	6584 (8)	14105 (8)

Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,2	15343	-	14110 (8)
Índice de lodo	g/100g	Anotar	-	-	14111 (8)
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín. (10)	H	6	-	-	14112 15751 (8)

Fonte: ANP, Resolução n° 14/2012.¹⁰

Nota:

(1) Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura de ensaio.

(2) Será admitido o limite de 380 mg/kg 60 dias após a publicação da Resolução. A partir de 1° de janeiro de 2013 até 31 de dezembro de 2013 será admitido o limite máximo de 350 mg/kg e a partir de 1° de janeiro de 2014, o limite máximo será de 200 mg/kg.

(3) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130° C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.

(4) O resíduo deve ser avaliado em 100% da amostra.

(5) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da tabela de especificação a cada trimestre civil. Os resultados devem ser enviados à ANP pelo Produtor de biodiesel, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de material graxo, o Produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de materiais graxos utilizados.

(6) O método ASTM D6890 poderá ser utilizado como método alternativo para determinação do número de cetano.

(7) Limites conforme Tabela II. Para os estados não contemplados na tabela o ponto de entupimento a frio permanecerá 19°C.

(8) Os métodos referenciados demandam validação para os materiais graxos não previstos no método e rota de produção etílica.

(9) Poderá ser determinado pelos métodos ABNT NBR 15908, ABNT NBR 15344, ASTM D6584 ou EN14105, sendo aplicável o limite de 0,25% em massa. Para biodiesel oriundo de material graxo predominantemente láurico, deve ser

utilizado método ABNT NBR 15908 ou ABNT NBR 15344, sendo aplicável o limite de 0,30% em massa.

(10) O limite estabelecido deverá ser atendido em toda a cadeia de abastecimento do combustível.

Tabela 2 Ponto de Entupimento de Filtro a Frio.

UNIDADES DA FEDERAÇÃO	LIMITE MÁXIMO, °C											
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
SP - MG - MS	14	14	14	12	8	8	8	8	8	12	14	14
GO/DF - MT - ES - RJ	14	14	14	14	10	10	10	10	10	14	14	14
PR - SC - RS	14	14	14	10	5	5	5	5	5	10	14	14

Fonte: ANP, Resolução nº 14/2012.¹⁰

O próximo tópico discorre a respeito de um dos principais parâmetros de qualidade do biodiesel, o teor de éster, suas respectivas características e os eventuais problemas técnicos ocasionados aos motores quando do uso de biodiesel fora dos limites estabelecidos pela Resolução acima.

3.3 Teor de Éster

O teor de éster no biodiesel é o foco do presente trabalho, portanto é pertinente que seja discutido.

O teor de éster é um dos principais parâmetros de qualidade do biodiesel. Os ésteres são o biodiesel propriamente dito, ou seja, enquanto uma gasolina perfeita seria composta apenas por octano um biodiesel perfeito seria exclusivamente uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos. Portanto, quanto maior o teor de éster melhor é o biodiesel. A alta pureza do biodiesel promove uma combustão mais limpa e eficiente; melhor rendimento do motor; gases de exaustão mais limpos e maior tempo de vida útil do motor. Um cuidado que deve ser tomado com o uso do biodiesel, em virtude das características solventes dos ésteres, é em relação á mangueiras, borrachas, elastômeros, pinturas e demais polímeros, pois o biodiesel pode dissolve-los. Esse problema é proporcionalmente reduzido quando se utiliza misturas de biodiesel com diesel. A indústria automobilística já dispõe de materiais e

tecnologia adequados para substituir as peças que podem ser atacadas pelo biodiesel.¹⁴

3.4 Cromatografia em Fase Gasosa

A Cromatografia é um método físico-químico de separação fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, sendo uma fase fixa de grande área superficial denominada fase estacionária e a outra um fluido que percorre a fase estacionária, denominada fase móvel.¹⁷

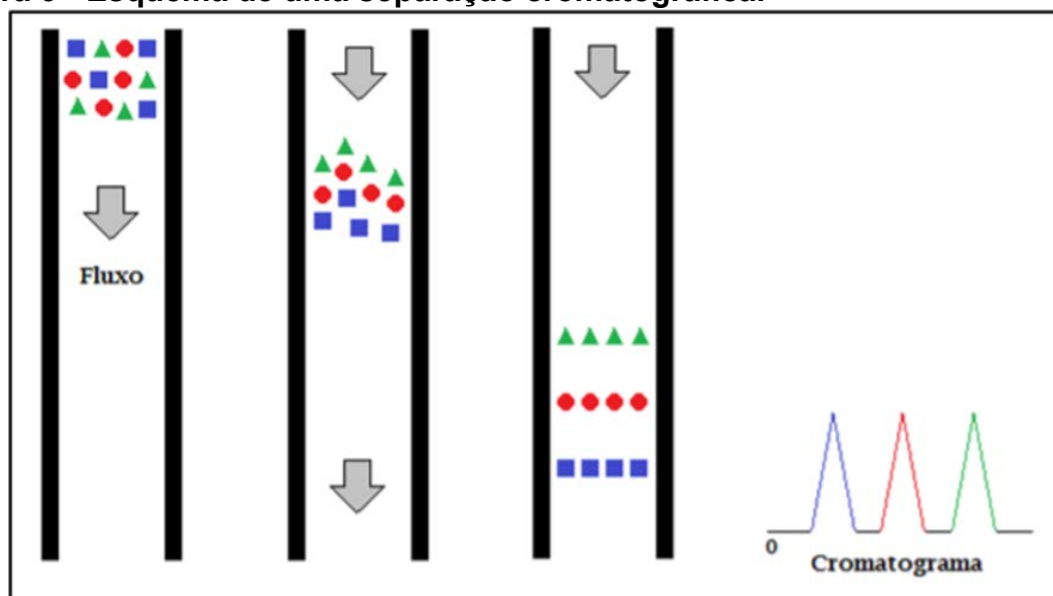
Na Cromatografia Gasosa (CG) para separação dos componentes individuais de uma amostra utiliza-se um gás inerte como fase móvel, denominada gás de arraste, cuja finalidade é transportar, através da coluna (fase estacionária), as moléculas a serem separadas. A Figura 3 mostra um esquema da separação de três componentes de uma mesma matriz e a construção de um cromatograma simples.

De acordo com a natureza da fase estacionária, pode-se diferir a cromatografia gasosa em cromatografia gás-líquido (CGL) e cromatografia gás-sólido (CGS).

Na CGS, a fase estacionária é um sólido de grande área superficial, usualmente um adsorvente como carvão vegetal, sílica-gel, ou peneira molecular (zeólita sintética). A adsorção diferencial dos componentes da mistura a ser separada sobre a superfície sólida é a base para a separação cromatográfica na CGS, que é geralmente, empregada na separação de gases como o nitrogênio, oxigênio, monóxido de carbono e outros.¹⁷

Na CGL, a fase estacionária é uma película delgada líquida, que recobre um sólido inerte, denominado suporte. A base para a separação cromatográfica, neste caso, é a distribuição da amostra dentro e fora desta película, ou seja, a partição da amostra entre a fase móvel e a fase líquida estacionária.

Figura 3 - Esquema de uma separação cromatográfica.



Fonte: MUNHOZ, J. F. V. L., 2008.¹⁹

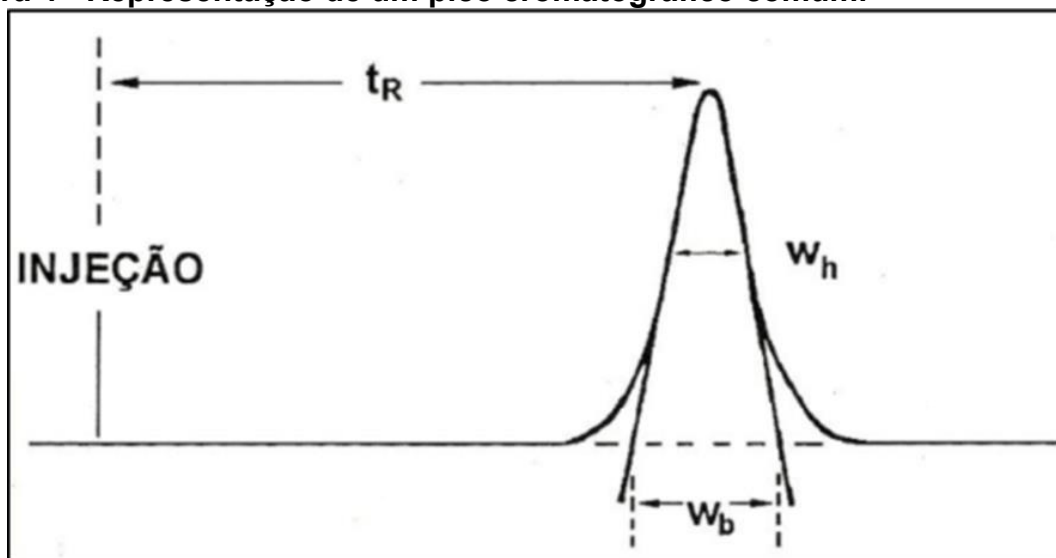
Em um cromatógrafo a gás, a amostra é introduzida em uma coluna capilar através de um injetor e, juntamente com o gás de arraste, é eluída até um detector, que deve ser capaz de detectar e medir a quantidade dos componentes da amostra que saem no efluente da coluna.¹⁴

3.4.1 Teoria Básica

Um cromatograma é o registro gráfico da análise, em que se indicam os componentes e o grau de concentração em que se encontravam presentes em um determinado tempo. Quando apenas o gás de arraste deixa a coluna, uma linha reta, paralela ao eixo do tempo é traçada. Esta linha é denominada linha de base. À medida que são eluídos, os componentes presentes na amostra, são registrados os perfis de variações correspondentes as suas concentrações, o que permite a obtenção de dois parâmetros fundamentais: o tempo de retenção e a área do pico.¹⁷

A representação de um pico comum em cromatografia é feita na Figura 4. Através da largura do pico, ou da largura da meia altura, é possível determinar a concentração do respectivo componente, pois a área do pico é proporcional à concentração do constituinte na amostra.¹⁷

Figura 4 - Representação de um pico cromatográfico comum.



Fonte: LANÇAS, F. M., 1993.¹⁷

As equações 1, e 2 mostram como determinar a área do pico através da largura do pico e a largura de meia altura respectivamente, onde A é a área, W_b é a largura do pico e W_h e a largura de meia altura, e h é a altura do pico.

$$A = \frac{W_b \times h}{2} \quad (1)$$

$$A = W_h \times h \quad (2)$$

O tempo de retenção, t_R , é o tempo transcorrido desde o momento da injeção da amostra até que se tenha obtido o máximo do pico. Este tempo é característico do soluto, da fase líquida, da vazão do gás de arraste e da temperatura da coluna. O mesmo pico, na mesma coluna, em idênticas condições terá sempre o mesmo tempo de retenção. Este fato permite a identificação dos picos, posto que devam ser reprodutíveis.¹⁷

A posição do pico é determinada pela velocidade da vazão de gás de arraste e pelo fator de retenção, denominado relação de partição ou relação de distribuição.

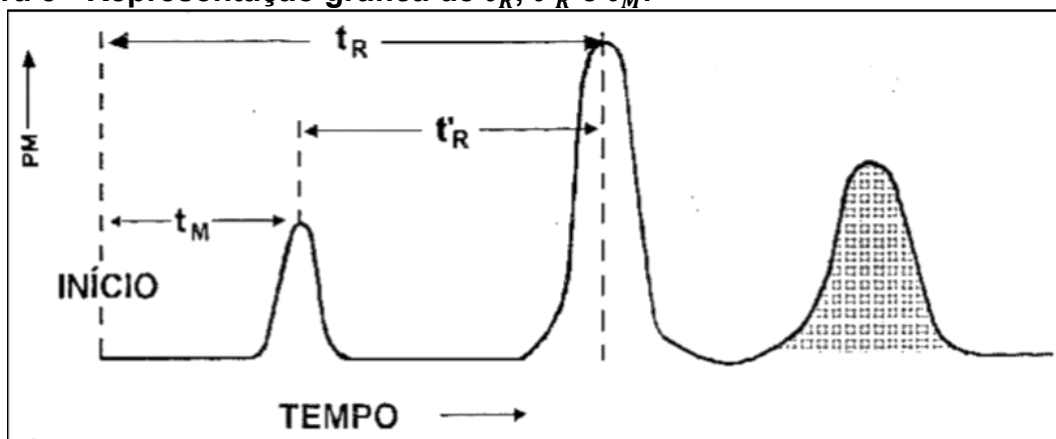
$$K = \frac{\text{quantidade de amostra na fase líquida}}{\text{quantidade de amostra na fase sólida}} \quad (3)$$

Esta relação entre a quantidade da amostra na fase líquida e na fase gasosa também está relacionada com o tempo de retenção:

$$t_R = t_M + t_M \cdot k = t_M + t'_R \quad (4)$$

Em que t_R é o tempo que transcorre desde o ponto da injeção até o máximo do pico e t_M é o tempo transcorrido desde o ponto de injeção até obter-se um pico inerte, ar por exemplo. É uma medida do tempo que cada componente da amostra permanece na fase gasosa.

Figura 5 - Representação gráfica de t_R , t'_R e t_M .



Fonte: LANÇAS, F. M., 1993.¹⁷

Pela Figura 5, nota-se que o tempo de retenção é a soma dos tempos que a amostra permanece nas duas fases: o tempo na fase móvel, t_M , e o tempo na fase estacionária, t'_R .

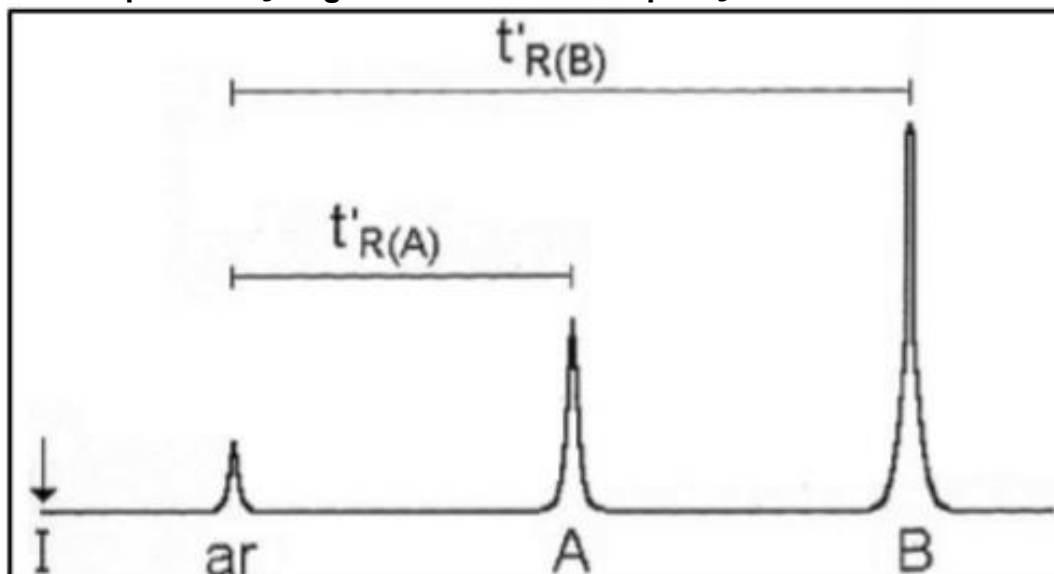
O fator de separação, α , é a relação existente entre o tempo que dois picos permanecem na fase móvel. Este fator é representado pela Figura 6 e pela equação 5.

$$\alpha = \frac{t'_R(B)}{t'_R(A)} \quad (5)$$

A principal utilidade de α é fornecer uma medida da seletividade da fase móvel com relação a dois componentes. Para $\alpha = 1$, os dois componentes terão a mesma solubilidade na fase estacionária e não poderão ser separados na mesma.

Quanto maior o valor de α , mais seletiva será a fase móvel e, conseqüentemente, melhor a separação de A e B.¹⁷

Figura 6 - Representação gráfica do fator de separação α .



Fonte: LANÇAS, F. M., 1993.¹⁷

A eficiência de uma coluna é determinada pelo número de pratos, N , gerados. Quanto maior o valor de N , melhor a eficiência e, portanto, melhor a separação. A equação 4 mostra a relação entre N , t_R e w_b .

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (6)$$

Em casos de picos mal resolvidos, nos quais w_b é difícil de ser medida, ou havendo severa variação na linha de base, o número de pratos pode ser calculado através da meia altura do pico, w_h :

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (7)$$

Diversos fatores afetam o valor de N , tais como: tempo de retenção, comprimento da coluna, temperatura da coluna, soluto, fluxo de gás, tamanho da amostra, técnica de injeção e assim por diante. O número de pratos pode ser

mudado desde que se variem estas condições, o que torna difícil uma comparação entre o número de pratos de diferentes colunas ou instrumentos.¹⁷

Os parâmetros operacionais de uma coluna podem ser avaliados por seu efeito sobre a altura equivalente a um prato, H , que corresponde à razão entre o comprimento da coluna, L , e o número de pratos teóricos, N , Assim:

$$H = \frac{L}{N} \quad (8)$$

Em que L é medido em centímetros, milímetros ou micrometros. Portanto, H é o comprimento necessário de uma coluna para gerar um prato teórico. Assim, quanto maior N , menor será H e mais eficiente será a coluna.¹⁷

Os fatores que determinam a largura dos picos podem ser expressos na equação de Van Deemter:

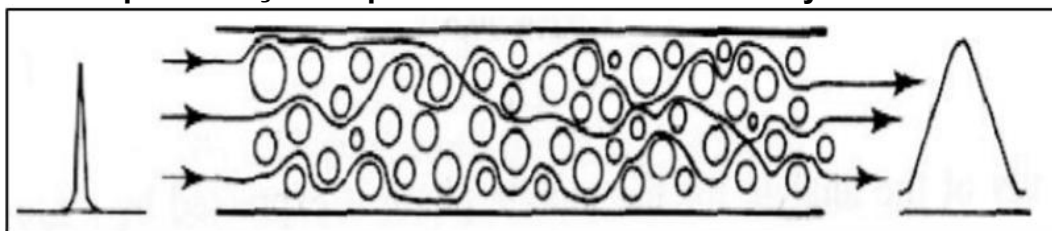
$$H = A + \frac{B}{\bar{\mu}} + C \times \bar{\mu} \quad (9)$$

Em que A é a Difusão de Eddy, B é a Difusão longitudinal, C são os Efeitos de Transferência de Massa e $\bar{\mu}$ é a velocidade linear média do gás de arraste dada por:

$$\bar{\mu} = \frac{L}{t_M} \quad (10)$$

A Difusão de Eddy, representada na Figura 7, é calculada através dos diversos caminhos que um analito pode percorrer na fase estacionária. Uma vez que os picos dependem da quantidade de constituinte da amostra que sai da coluna, ao tomarem diferentes percursos, o pico é alargado. Contudo, em uma coluna capilar, $A=0$, posto que não há partículas, considerando a coluna um tubo simples.¹⁸

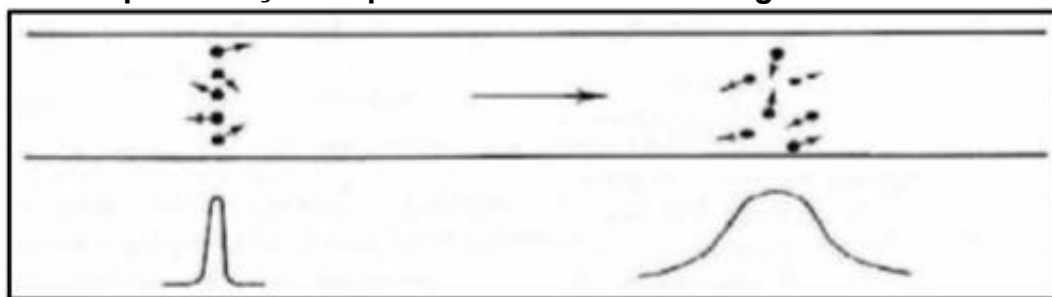
Figura 7 - Representação esquemática da Difusão de Eddy.



Fonte: MUNHOZ, J. F. V. L., 2008.¹⁹

Já o termo B, Difusão Longitudinal, representado na Figura 8, descreve como as moléculas atravessam a coluna sob a influência da fase móvel. Devido à difusão molecular no interior da coluna, quanto maior a vazão de gás, menor a dispersão do analito e menor será o valor de H , estreitando o pico.¹⁸

Figura 8 - Representação esquemática da Difusão Longitudinal.



Fonte: MUNHOZ, J. F. V. L., 2008.¹⁹

Por fim, o termo C, que remete aos Efeitos de Transferência de Massas, representado na Figura 9 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, aumenta devido ao desequilíbrio, que não ocorre instantaneamente, entre a fase estacionária e a fase móvel. Consequentemente, parte do componente na fase móvel tende a ser eluído mais rapidamente do que a parte que está na fase estacionária. Isto gera um alargamento do pico.¹⁸

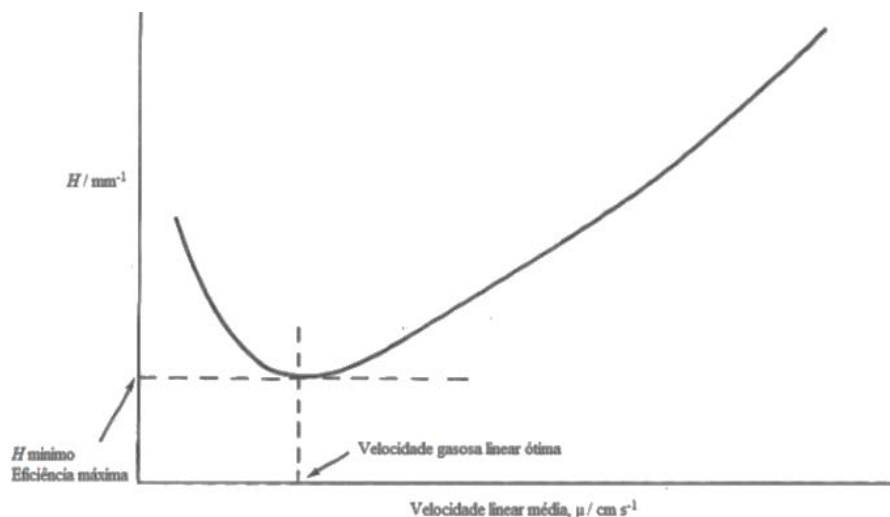
Figura 9 - Representação esquemática dos Efeitos de Transferência de Massas.



Fonte: MUNHOZ, J. F. V. L., 2008.¹⁹

A representação gráfica da equação de van Deemter é descrita na Figura 10. O mínimo da curva representa a menor altura do prato e o máximo de eficiência da coluna cromatográfica.

Figura 10 - Representação gráfica da equação de van Deemter.



Fonte: LANÇAS, F. M., 1993.¹⁷

Um último conceito a ser introduzido é a resolução, R_S . Trata-se de uma medida quantitativa da separação de dois picos consecutivos, sendo descrita como:

$$R_S = \frac{T_{R2} - T_{R1}}{\frac{1}{2}(w_{b1} + w_{b2})} = \frac{2\Delta t_R}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (11)$$

O valor Δt_R é uma medida da separação dos máximos dos picos adjacentes. Este termo poderá ser aumentado reduzindo-se a temperatura, ou escolhendo-se uma fase mais seletiva, maior α . Já w_b é uma medida de eficiência da coluna e está relacionada com a velocidade de alargamento da banda, podendo ser medido por N ou por H.¹⁷

Além do número de pratos e da seletividade, a resolução depende da posição relativa dos picos no cromatograma. Assim, pode-se reescrever a equação anterior na forma:

$$R = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{k}{k+1} \right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \quad (12)$$

Esta equação é denominada equação mestra da resolução.¹⁸

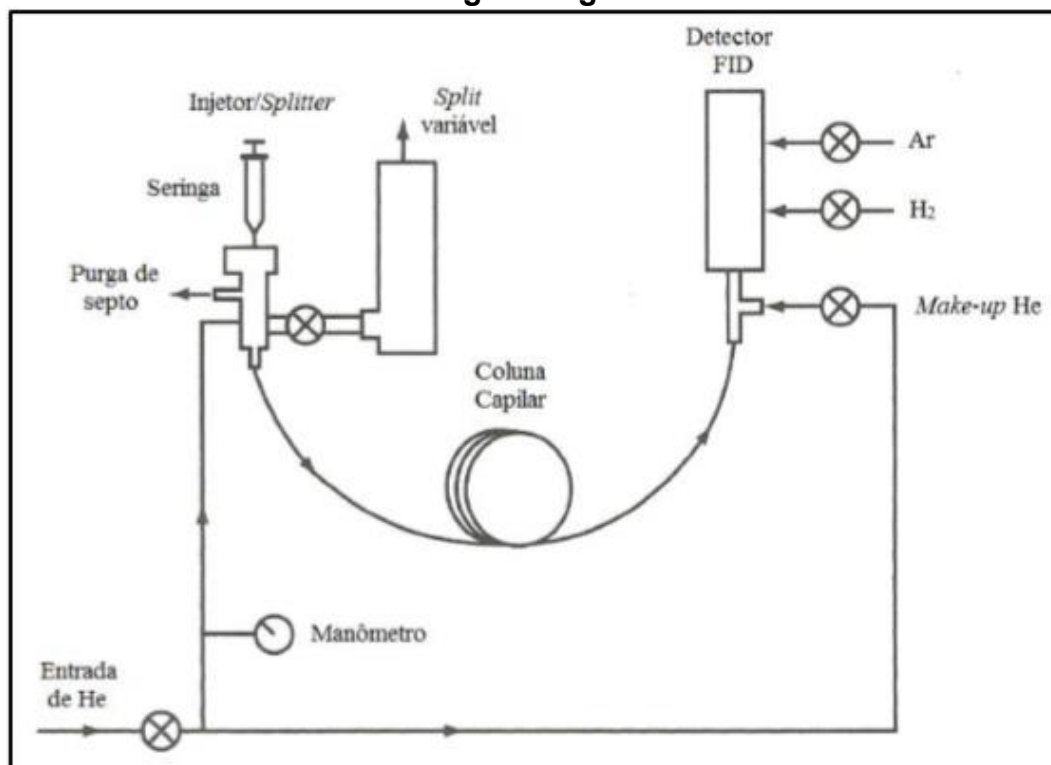
3.4.2 Instrumentação

A Figura 11, representa, esquematicamente, o sistema de um cromatógrafo a gás básico.

Um gás de arraste inerte, provindo de um grande cilindro de gás, flui continuamente através da porta de injeção, da coluna e do detector. A taxa de vazão do gás é devidamente controlada para se assegurar a reprodutibilidade dos tempos de retenção e para reduzir os ruídos e desvios gerados pelo detector. A amostra é, então, injetada, com uma microseringa (caso a amostra seja líquida), na porta de injeção previamente aquecida. Realizada a injeção, a amostra é vaporizada e carregada através da coluna, comumente capilar de 15 a 30m de comprimento, com um filme fino interno de 0,2 μm de espessura (fase estacionária). Os componentes da amostra são, assim, separados pelas fases móvel e estacionária, baseados na solubilidade relativa e pressão de vapor relativa.²⁰

Em seguida, o gás de arraste e a amostra passam por um detector, que mede a quantidade de analito gerando um sinal elétrico. Este sinal é processado, a fim de gerar um cromatograma correspondente. Na maior parte dos casos, o sistema de tratamento de dados, comumente um computador com o software próprio do cromatógrafo, integra a área dos picos, realiza os cálculos e imprime um relatório com os resultados quantitativos e tempos de retenção.²⁰

Figura 11 - Sistema de um cromatógrafo a gás básico.



Fonte: McNAIR, H. M.; MILLER, J. M., 2009.²⁰

3.4.3 Gás de Arraste

A principal funcionalidade do gás de arraste é, como o próprio nome diz, “arrastar” a amostra através da coluna, ou seja, agir como a fase móvel. Deve ser inerte e não pode interagir quimicamente com a amostra. Sua segunda função é prover uma matriz adequada para o detector diferenciar os componentes da amostra. A Tabela 3 mostra quais gases de arraste são ideais para cada tipo de detector.²⁰

Tabela 3. Gases de arraste ideais para cada detector.

Detector	Gás de arraste
Condutividade Térmica	Hélio
Ionização de Chama	Hélio, Nitrogênio ou Hidrogênio
Captura de Elétrons	Nitrogênio muito seco

Fonte: McNAIR, H. M.; MILLER, J. M., 2009.²⁰

3.4.4 Injetores

Colunas capilares possuem alguns requisitos para injeções de amostras: a injeção precisa ser realizada rapidamente e a quantidade de amostra deve ser muito pequena, geralmente, menor que 1µg. Em uma coluna capilar típica de 25m, há cerca de 10mg de fase líquida. Isso mostra que se forem injetadas grandes quantidades de amostra, a coluna pode ser entupida, ou ocorrer vazamentos.

Picos provenientes de colunas capilares são muito estreitos, havendo larguras de poucos segundos, por isso, injeções rápidas são necessárias, a fim de minimizar o alargamento de banda produzido por uma injeção lenta.²⁰

Os injetores podem ser classificados em *split*, *splitless*, *on-column* e *PTV*. Os mais comuns são os dois primeiros e estão descritos a seguir.

3.4.4.1 Injeção Split

A Figura 12 mostra uma secção transversal de um injetor *split* comum.

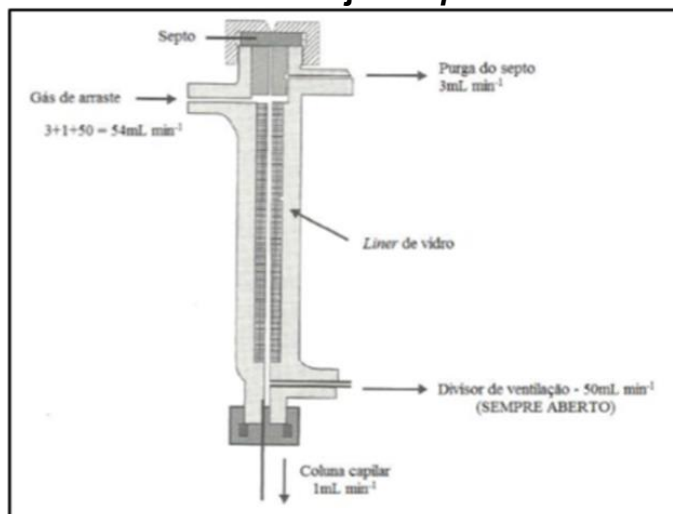
A injeção *split* é a técnica mais simples e a mais fácil a ser usada. O procedimento envolve, normalmente, a injeção de 1µL de amostra com uma seringa padrão através de uma porta de injeção aquecida contendo um *liner* de vidro desativado.

A amostra é rapidamente vaporizada e apenas uma fração, geralmente 1-2%, do vapor entra na coluna. O restante da amostra vaporizada e um grande fluxo de gás de arraste passam pela purga do septo.

A técnica é simples, pois o operador precisa apenas controlar a taxa de *split* abrindo ou fechando a purga do septo. A quantidade de amostra introduzida na coluna é muito pequena e a taxa de fluxo até o ponto de *split* é rápida (soma da taxa de fluxo da coluna e da ventilação). Isto resulta em separações de alta resolução. Outra vantagem é a introdução de amostras concentradas sem a necessidade de diluí-las, uma vez que se use uma taxa de *split* alta.

Uma desvantagem dessa técnica de injeção é a limitação da análise de traços, posto que apenas uma fração é inserida na coluna. Uma segunda desvantagem é que esse modo de injeção, algumas vezes, discrimina solutos com altos pesos moleculares na amostra, tornando a amostra que entra na coluna não representativa da amostra injetada.²⁰

Figura 12 - Secção transversal de um injetor *split*.



Fonte: McNAIR, H. M.; MILLER, J. M., 2009.²⁰

3.4.4.2 Injeção Splitless

A Figura 13 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** mostra uma secção transversal de um injetor *splitless* comum.

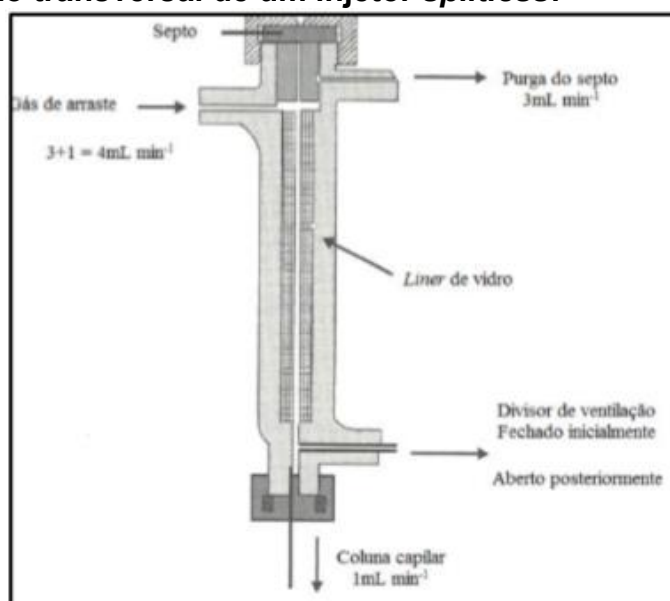
A injeção *splitless* utiliza o mesmo equipamento da injeção *split*, porém com a válvula de *split* inicialmente fechada. A amostra é diluída em um solvente volátil, como hexano ou metanol, e de 1 a 5 μ L é injetado na porta de injeção aquecida. A amostra é vaporizada e lentamente (com taxa de vazão do gás de arraste por volta de 1 mL/min) carregada até uma coluna fria (temperatura da coluna abaixo da temperatura de ebulição dos compostos), na qual amostra e solvente são condensados. Após cerca de 60s, dependendo da vazão de gás na coluna, a válvula de separação é aberta e qualquer vapor residual deixado na porta de injeção é rapidamente varrido para fora do sistema. Purga do septo é essencial em injeções *splitless*.

A coluna possui temperatura programada e, no início, apenas os solventes voláteis são vaporizados e levados através da coluna. Enquanto isso, os analitos são concentrados em uma banda estreita do solvente residual. Após algum tempo, esses compostos são vaporizados pelo aquecimento da coluna e separados cromatograficamente. Observa-se uma alta resolução dos constituintes com pontos de ebulição elevados.

A grande vantagem da injeção *splitless* é a melhora na sensibilidade em relação a injeção *split* e, com a consequente, melhora na análise de traços para amostras farmacêuticas, biomédicas e ambientais.

Por outro lado a injeção *splitless* tem algumas desvantagens. Consome muito tempo, já que se inicia com uma coluna em temperaturas menores, tornando necessária a programação da temperatura. Deve-se diluir a amostra com solvente volátil para que o analito seja concentrado no topo da coluna, portanto esse tipo de injeção não é indicada para compostos com pouca diferença de volatilidade em relação ao solvente utilizado. Para a obtenção de um bom cromatograma, os primeiros picos de interesse devem ter pontos de ebulição 30°C acima do ponto de ebulição do solvente.²⁰

Figura 13 - Secção transversal de um injetor *splitless*.



Fonte: McNAIR, H. M.; MILLER, J. M., 2009.²⁰

3.4.5 Coluna

A coluna é considerada o “coração do sistema cromatográfico”, uma vez que é nela que irá ocorrer a separação dos componentes. A escolha da coluna apropriada é de suma importância e muitas vezes difícil. Dentre vários fatores que devem ser considerados, a escolha da fase estacionária ganha destaque, uma vez que, é esta que interage seletivamente com os componentes da amostra realizando a separação. Geralmente as colunas têm formato espiral, para ocuparem menor

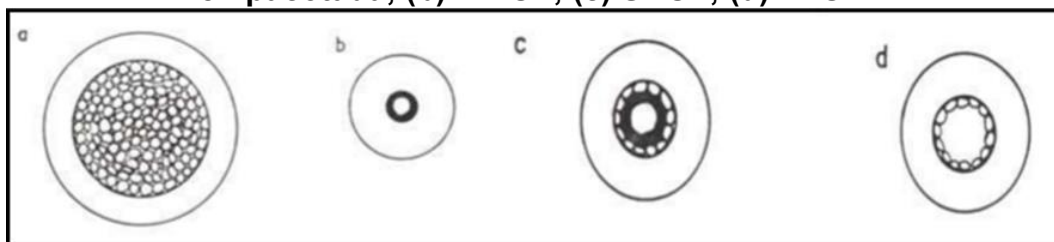
espaço e seu diâmetro interno e comprimento dependem do propósito da análise. Existem dois tipos principais de colunas, as empacotadas e as capilares. As colunas empacotadas são constituídas preferencialmente com aço inoxidável ou vidro. Estas colunas possuem um diâmetro interno de 1 a 100 mm e comprimento de 1 a 3 m. A fase estacionária é um sólido ou líquido pouco volátil aderido a um suporte inerte. Porém quando se utiliza esse tipo de coluna podem ocorrer interações do soluto com a fase estacionária e o alargamento das bandas (sobreposição de picos), isto é resultante da difusão nas fases móveis e estacionárias, do não equilíbrio nas distribuições e do acondicionamento não uniforme da coluna. Para reduzir ou até eliminar as causas desses problemas surgiu a cromatografia gasosa de alta resolução, onde a diferença principal com a cromatografia gasosa convencional é a substituição da coluna empacotada pela coluna capilar.

As colunas capilares foram introduzidas por Golay em 1958 e, hoje são empregadas na grande maioria das aplicações, podem ser constituídas de aço inoxidável, vidro, níquel e, de preferência, sílica fundida que permite produzir colunas flexíveis, sendo altamente inerte e pura.¹⁴

O diâmetro interno varia entre 0,1 e 0,5 mm e o comprimento varia entre 5 e 50 m. A fase estacionária nas colunas capilares é depositada na forma de um filme fino e uniforme na parede interna do tubo, deixando a parte central oca. Desta maneira a difusão das moléculas dentro e fora da fase será muito maior do que na coluna empacotada, onde o suporte sólido funciona como um “obstáculo” a difusão da amostra e do gás de arraste.¹⁷

A figura 14 mostra vários tipos de colunas capilares. As colunas capilares com parede recoberta (WCOT – *wall-coated open tubular*) possuem parede interna do capilar recoberta com um filme da fase estacionária. Nas colunas capilares com suporte recoberto (SCOT – *support-coated open tubular*), a parede interna do capilar é recoberta com uma camada de um adsorvente (suporte) recoberto com a fase estacionária líquida. Se a parede do capilar for recoberta apenas com uma camada do adsorvente que, neste caso, é a própria fase estacionária, têm-se as colunas capilares com camada porosa (PLOT – *porous-layer open tubular*). Atualmente, têm-se usado fases estacionárias imobilizadas as paredes do tubo (WBOT – *wall bonded open tube*), resultando, em menor volatilização da fase estacionária (“sangramento”) com o aumento da temperatura.²¹

Figura 14 - Tipos de coluna para Cromatografia Gasosa: (a) coluna empacotada; (b) WCOT; (c) SCOT; (d) PLOT.



Fonte: COLLINS, C. H, et al., 2006.²¹

Nas colunas capilares há um aumento significativo no número de pratos em relação as colunas empacotadas, ou seja, na capacidade de separação, pois a pressão é muito menor que em colunas empacotadas e, conseqüentemente, o comprimento da coluna pode ser muito maior. Outras vantagens no uso de colunas capilares é a eliminação do alargamento de bandas devido a irregularidades no preenchimento da fase estacionária, bem como permitir análises mais rápidas, mesmo em temperaturas baixas. As colunas capilares devem apresentar estabilidade física e química. A primeira refere-se à estabilidade do filme depositado sobre as paredes do capilar, pois altas velocidades do gás de arraste tendem a deslocar o filme tornando-o não homogêneo e possibilitando a formação de bolhas. A instabilidade química ocorre quando as fases, em altas temperaturas ou em contato com a superfície ativa dos capilares, sofrem decomposição, formando produtos que são arrastados para fora da coluna, causando uma instabilidade da linha base.²²

À medida que a amostra é injetada na coluna, ela se distribui entre as duas fases, os picos que demoram a eluir, se tornam mais largos, enquanto que, quanto mais estreito o pico, mais eficiente será a separação e mais fácil a quantificação das espécies eluídas.¹⁷

Outro fator importante na separação dos componentes na coluna é a polaridade da coluna. A escolha de uma fase estacionária pode ser feita comumente com base na polaridade dos componentes que vão ser separados. A polaridade da fase estacionária pode ser explicada em termos de forças de interação. Por exemplo, solutos não polares geralmente tendem a ser separados na ordem de seus pontos de ebulição em solventes não polares, visto que as forças de dispersão entre o soluto e o solvente são da mesma ordem das moléculas do solvente sozinhas. Quando uma fase estacionária não polar é utilizada, os solutos polares são eluídos

muito mais rapidamente que os pouco polares de mesmo ponto de ebulição. Em geral, os solutos são retidos de acordo com a polaridade da fase estacionária.²³

3.4.6 Detectores

Um detector capta os eluentes de uma coluna e fornece uma resposta na forma de um cromatograma. Os sinais do detector são proporcionais à quantidade de cada analito, tornando possível uma análise quantitativa.

O mais comum é o Detector de Ionização de Chama (FID) (do acrônimo em inglês *Flame Ionization Detector*). Possui alta sensibilidade, linearidade e, além disso, é relativamente simples e com baixo custo. Outros detectores populares são o TCD (do acrônimo em inglês *Thermal Conductivity Detector*) e o ECD (do acrônimo em inglês *Electron Capture Detector*).²⁰

3.4.6.1 Detector de Ionização de Chama

A figura 15 mostra a secção transversal de um típico detector FID.

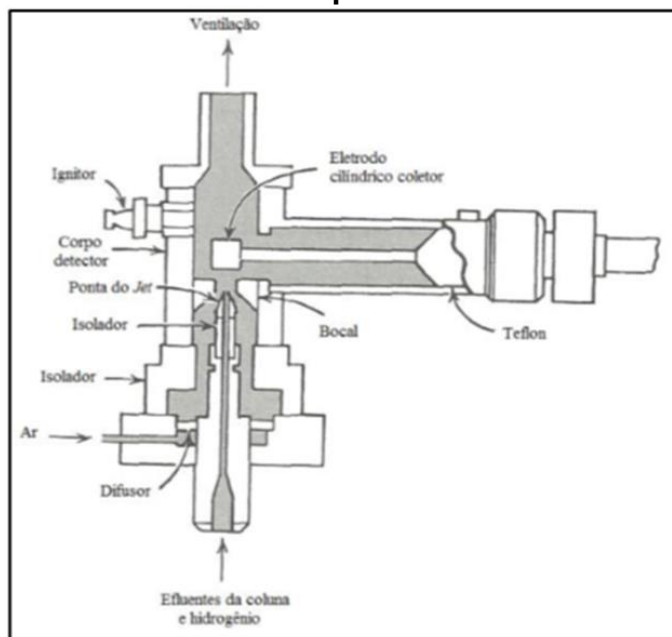
Como fora dito, o FID é o mais amplamente usado em CG. Os efluentes da coluna são queimados em uma pequena chama de ar sintético-hidrogênio, produzindo alguns íons no processo. Estes são coletados e formam uma pequena corrente que é transformada em um sinal. Quando não há amostras na chama, ocorre pouca ionização e uma pequena corrente, cerca de 10^{-14} A, proveniente de impurezas do hidrogênio e do ar sintético.

Conforme foi mostrado na Figura 11, os eluentes da coluna são misturados com hidrogênio, ou são previamente misturados se H_2 for usado como gás de arraste, e levados até a ponta de um pequeno queimador, o qual está cercado por alto fluxo de ar sintético, que auxilia a combustão. A ignição da chama é feita automaticamente. O eletrodo coletor é polarizado em cerca de +300V em relação à ponta da chama e a corrente coletada é amplificada por um circuito de alta impedância. Posto que há formação de água no processo de combustão, o detector precisa ser aquecido até pelo menos 125°C, a fim de evitar a condensação da água e de amostras com alto ponto de ebulição. Grande parte dos FID funciona em temperaturas maior ou igual a 250°C.

O exato mecanismo da ionização em chama ainda não é conhecido. O FID responde a todos os compostos orgânicos que queimam em chama de ar sintético-

hidrogênio. O sinal é aproximadamente proporcional ao conteúdo de carbono, dando origem à regra igual por carbono, um fator de resposta constante obtido através da conversão de todos os átomos de carbono em um soluto orgânico em metano no processo de combustão no detector.²⁰

Figura 15 - secção transversal de um típico detector FID.



Fonte: McNAIR, H. M.; MILLER, J. M., 2009.²⁰

Assim, todos os hidrocarbonetos devem mostrar uma mesma resposta por átomo de carbono. Se houverem heteroátomos presentes, como oxigênio ou nitrogênio, o fator de resposta diminui. Valores relativos são tabulados como Número Efetivo de Carbonos (NEC) e alguns estão descritos na Tabela 4.

Para uma operação eficiente, os gases (hidrogênio e ar sintético) devem ser puros e livres de materiais orgânicos, que possam elevar a ionização de fundo. A taxa de fluxo precisa ser otimizada para cada diferente modelo de detector. A taxa de fluxo de hidrogênio tem um máximo de sensibilidade para cada taxa de fluxo de gás de arraste. Colunas tubulares abertas possuem fluxos por volta de 1 mL min^{-1} , assim, um gás auxiliar (make-up) é adicionado ao gás de arraste para elevar o total para 30 mL min^{-1} .²⁰

Tabela 4. Número Efetivo de Carbonos (relativos ao heptano).

Composto	NEC	NEC Teórico
Acetileno	1,95	2
Hexeno	5,82	6
Etanol	2,52	2,5
Butanal	3,12	3
Ácido Acético	1,01	1
Acetato de Metila	1,04	2
Acetona	2,00	2

Fonte: McNAIR, H. M.; MILLER, J. M., 2009.²⁰

Gás hidrogênio pode ser usado como gás de arraste, desde que avaliados o fluxo de gás e o modelo do detector. Devem ser tomadas outras medidas de precaução, como uma fonte de hidrogênio separada (em local afastado).

A taxa de fluxo de ar possui valores entre 300-400mL min⁻¹, o suficiente para a maioria dos detectores.

Compostos que não contém carbono orgânico não queimam e não são detectados. Os mais importantes estão listados no Tabela 5. O mais significativo é a água, já que produz picos largos e assimétricos. A ausência de picos de água permite a utilização do FID em análises de amostras contendo H₂O, desde que não interfira no cromatograma. Aplicações típicas incluem contaminantes orgânicos em água, vinho e outras bebidas alcoólicas e produtos alimentícios.²⁰

Tabela 5. Substâncias que dão baixas ou nenhuma resposta no FID.

He	CS ₂	NH ₃
Ar	COS	CO
Kr	H ₂ S	CO ₂
Ne	SO ₂	H ₂ O
Xe	NO	SiCl ₄
O ₂	N ₂ O	SiHCl ₃
N ₂	NO ₂	SiF ₄

Fonte: McNAIR, H. M.; MILLER, J. M., 2009.²⁰

Em suma, as vantagens do uso do FID são sua boa sensibilidade, grande linearidade, simplicidade, robustez e adaptabilidade a todos os tamanhos de colunas.

3.5 Cromatografia Gasosa Ultrarrápida

Com o passar dos anos, as técnicas cromatográficas evoluíram. O primeiro aspecto a ser melhorado foi a coluna cromatográfica, com o surgimento de novas fases estacionárias e de colunas capilares. Em seguida, a preparação da amostra a ser injetada no cromatógrafo. Só então, a atenção voltou-se para o tempo de análise. Assim, surgiram as técnicas de Cromatografia Gasosa Rápida, Cromatografia Gasosa Muito Rápida e Cromatografia Gasosa Ultrarrápida. A evolução será abordada a seguir.

3.5.1 Evolução

Por volta de 1960, vem surgindo teorias relacionadas à redução de tempo de análise na CG. Nesta época, ainda se utilizavam colunas empacotadas longas, com diâmetro interno reduzido, e capazes de atingir desempenho de 10 pratos efetivos por segundo.

Em 1958, Golay introduziu as chamadas colunas capilares, que suprimiram algumas das limitações relacionadas as colunas empacotadas, tais como aumento de resolução e possibilidade de separação de matrizes mais complexas. Estudos posteriores mostraram a capacidade destas colunas de realizarem separações mais rápidas, conforme o diâmetro interno fosse reduzido.²⁴

Com o surgimento e aprimoramento de novas fases estacionárias e colunas capilares, a resolução cromatográfica em CG desenvolveu-se cada vez mais. Contudo, até 1980, a problemática relacionada ao aumento de velocidade não estava atrelada somente a limitações das colunas. Outras variáveis precisavam ser consideradas como limitações do equipamento de época e o tempo necessário para preparação de uma amostra e posterior tratamento dos dados obtidos do cromatograma, o que excedia e muito ao tempo da separação cromatográfica.²⁵

Conforme os cromatógrafos foram evoluindo, juntamente com o surgimento de novas fases estacionárias e do desenvolvimento de softwares avançados para

tratamento de dados cromatográficos, o estudo do aumento da velocidade em uma separação cromatográfica voltou a ser foco de muitos pesquisadores.²⁵

Os usuários de cromatografia passaram a questionar algumas das condições experimentais convencionalmente utilizadas e chegaram à conclusão que a resolução cromatográfica poderia ser reduzida para um valor limite que não causasse prejuízos para a identificação dos compostos presentes em uma amostra. Isto reduziria o tempo de análise em CG. Assim, constatou-se que os três fatores mais importantes para se realizar uma separação rápida são:

1. Minimização da resolução cromatográfica para um valor apenas suficiente, de modo a reduzir o número de pratos teóricos, N , requeridos para uma dada separação. Pode ser feito reduzindo o comprimento da coluna e empregando altas velocidades do gás de arraste;
2. Maximização da seletividade do sistema cromatográfico. Em separações rápidas, as propriedades das colunas são essenciais para melhorar a distinção entre pares críticos de componentes de uma amostra (com tempos de retenção próximos);
3. Proposição de alternativas que reduzam o tempo de análise, mantendo a resolução constante: determinados parâmetros podem ser explorados caso o tempo de análise em uma resolução mínima aceitável ainda exceda o tempo desejável. Exemplo: redução do diâmetro interno da coluna, para compensar a inevitável perda da resolução, quando se diminui o comprimento da coluna.²⁵

3.5.2 Definição

Os conceitos que fundamentam o aumento de velocidade em CG são estabelecidos através de diversos parâmetros, ao invés do tempo de análise somente. Dagan e Amirav introduziram um fator para quantificar o aumento da velocidade: SEF (do acrônimo em inglês Speed Enhancement Factor). A partir deste, a CG foi subdividida em três categorias: Cromatografia Gasosa Rápida (CG-R), Cromatografia Gasosa Muito Rápida (CG-MR), e Cromatografia Gasosa Ultrarrápida (CG-UR), além da Cromatografia Gasosa Convencional (CG-C).

O SEF não necessariamente reflete a exata redução do tempo de análise, porém normaliza as separações em função da CG-C, que é caracterizada pela

utilização de coluna de 30m com diâmetro interno reduzido, menor que 0,25mm, de tal forma que a vazão de gás de arraste na coluna seja de 1mL min^{-1} (correspondente a He com velocidade linear de 34cm s^{-1}). Este fator é definido pelo produto do fator de redução do comprimento da coluna e do fator que relaciona o aumento da velocidade do gás de arraste em relação a CG-C. Como exemplo, a CG-UR apresenta um fator de aumento de velocidade na faixa de 400 a 4000 vezes em relação à CG-C.

Vários autores apresentaram diferentes definições, baseadas nas larguras dos picos cromatográficos, w_b e w_h , e no tempo total de análise, para a classificação dos diferentes tipos de CG. Magni et al. apresentaram uma definição mais detalhada, divergindo das apresentadas até o momento. Segundo esta nova definição, fatores como dimensões da coluna e a taxa de aquecimento também foram considerados. Como apresentado na Tabela 6, separações ultrarrápidas somente seriam obtidas com colunas com dimensões muito reduzidas e altas taxas de aquecimento, resultando em picos com largura entre 0,05 e 0,2s.²⁵

Tabela 6. Principais parâmetros para a caracterização das diversas modalidades de cromatografia gasosa.

Classificação segundo Magni	CG-UR	CG-R	CG-CC ²	CG-C
Comprimento da coluna / m	2 a 10	5 a 15	25 a 30	25 a 30
Diâmetro interno / mm	0,05 a 0,10	0,10 a 0,25	0,25	0,25 a 0,32
Tempo de análise / min	1 a 3	≤10	3 a 15	10 a 60
Taxa de aquecimento / °C min ⁻¹	> 60	15 a 60	5 a 40	1 a 10
Largura do pico / s	0,05 a 0,2	0,5 a 2	1 a 5	1 a 10

Fonte: SEQUINEL, R. et al.,2010.²⁵

² Cromatografia gasosa com coluna curta

Embora os termos apresentados, CG-UR, CG-R dentre outros, sejam comumente encontrados na literatura, não existe uma posição acadêmica consolidada a respeito destas classificações. Permitindo, assim, uma classificação mais subjetiva por parte dos usuários de cromatografia, principalmente em relação à CG-UR.²⁵

3.5.3 Principais parâmetros envolvidos na redução do tempo de análise

Em cromatografia gasosa a eficiência do processo de separação é influenciada por uma série de fatores, dentre os quais se podem citar: tempo de retenção, comprimento da coluna, temperatura da coluna, pressão do gás de arraste, complexidade da amostra, técnica de injeção, entre outros. Atenção especial deve ser dada a tais parâmetros quando se pretende aumentar a velocidade de uma separação cromatográfica, de modo que a resolução cromatográfica possa ser reduzida a um valor mínimo, encurtando o tempo de análise sem, comprometer a identificação dos pares críticos de componentes da amostra. A Equação 13 relaciona o tempo de análise com os parâmetros anteriormente citados.²⁵

$$t_R = (1 + k) N_{req}^{\frac{3}{2}} \frac{9}{8} \sqrt{3} F(k) \left[\frac{n}{p_o D_{m,o}} \right] d_c \quad (13)$$

onde t_R é o tempo de retenção, k é o fator de retenção, F é dada em função do fator de retenção, n é a viscosidade dinâmica, p_o é a pressão na saída do sistema, $D_{m,o}$ é o coeficiente de difusão do soluto na fase móvel em relação à pressão na saída, d_c é o d.i. da coluna capilar. O número de pratos requeridos para a separação, N_{req} , é dado em função do fator de separação (α) de dois picos, do fator de retenção e, principalmente, em função da resolução (R_s) para um par crítico de componentes da amostra. De acordo com a Equação 13, reduções significativas no tempo de análise podem ser obtidas, principalmente, com a utilização de colunas de dimensões reduzidas e com o aumento da pressão ou aplicação de vácuo na saída do sistema. Ainda com base nesta equação, há uma relação direta entre t_R e o termo referente à fase gasosa: $t_R \propto [n/p_o D_{m,o}]$. Este termo tem um valor mínimo para o hidrogênio, que apresenta menor viscosidade e maior coeficiente de difusão quando comparado (na mesma temperatura) com outros gases usualmente utilizados em CG, tais como hélio e nitrogênio. Além disso, um coeficiente de difusão relativamente alto confere ao hidrogênio um desempenho melhor do que os outros gases quando são utilizadas velocidades lineares maiores.

Aproximações matemáticas diferentes evidenciam também a influência de outros parâmetros, conforme a Equação 14.²⁵

$$t_R = 36 \left[\left(\frac{(1+k)^3}{k^2} \right) \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \right] \left[\frac{H}{u_o f_2} \right] \quad (14)$$

onde 36 é o valor constante para separação do par crítico com resolução de 1,5 na linha de base, H é a altura equivalente a um prato teórico, u_o é a velocidade linear do gás de arraste na saída da coluna e f_2 é o fator de correção da compressibilidade do gás de arraste.²⁵

Existe uma complexa dependência do tempo de análise com a pressão, de modo que as condições ótimas para estas equações são aproximadas e, assim, puramente matemáticas. Relações explícitas só poderiam ser obtidas sob condições extremas, quando as razões de pressão de entrada e saída do sistema forem muito baixas ou muito altas ou ainda quando a influência da fase estacionária for negligenciável. Na modalidade CG-UR também deve ser considerado que a determinação de ótimas taxas de aquecimento têm influência direta na qualidade da separação e velocidade da análise. Assim, não somente altas taxas de aumento de temperatura, como também curtos períodos de resfriamento e retomada da temperatura da coluna devem ser levados em consideração para a realização de análises mais rápidas.²⁵

3.5.4 Instrumentação da CG-UR

O aumento da velocidade não necessariamente dependerá da substituição ou mesmo da adaptação dos equipamentos convencionais da CG, já que nem sempre os equipamentos convencionais são compatíveis com a velocidade requerida. Para uma redução de duas a quatro vezes no tempo total de uma análise cromatográfica, a utilização de colunas de dimensões reduzidas acompanhada por simples alterações feitas em alguns parâmetros cromatográficos, tais como aumento na taxa de aquecimento e otimização da velocidade do gás de arraste, podem ser suficientes. Contudo, para separações ultrarrápidas, redução de dez vezes ou mais no tempo de análise, pode se requerer uma adaptação significativa dos cromatógrafos convencionais. Para isso, são obrigatórios amostradores automáticos de alta velocidade, sistemas para aquecimento rápido da coluna e detectores com altas taxas de aquisição.²⁵

3.5.5 Amostradores e Injetores e Detectores

São necessários amostradores automáticos, devido ao pequeno volume de injeção de amostra uma vez que em sistemas ultrarrápidos utilizam colunas com menor capacidade de processamento de amostra, de preferência amostradores automáticos de alta velocidade, a fim de obter uma máxima diminuição do tempo necessário para se completar um ciclo analítico. A injeção de nanovolumes pode ser uma ferramenta muito útil. Neste caso, seriam necessárias pequenas adaptações nos amostradores automáticos, como a utilização de seringas com êmbolo na agulha (plunger-in-needle syringe).

Dos injetores convencionais, todos podem ser aplicados em CG-UR em princípio. Já os detectores é importante que sejam de alta frequência de aquisição de dados.²⁵

Coluna Cromatográfica

As colunas capilares utilizadas em CG-UR possuem dimensões reduzidas. Tais colunas são de fundamental importância, pois diminuem o tempo de análise e aumentam a resolução dos cromatogramas. A variação do diâmetro interno em uma coluna cromatográfica promove um balanço entre dois fatores: a eficiência e a capacidade da coluna. A otimização de um destes requer a minimização do outro.

Em CG-UR, a utilização de colunas com diâmetro interno reduzido, as chamadas narrow bore columns, proporciona um aumento no valor de N , gerando picos mais estreitos, e surge como alternativa a perda de resolução em decorrência da diminuição do comprimento da coluna.

As separações ultrarrápidas também são facilitadas com o uso de colunas com depósito fino de fase estacionária, em que a resistência oferecida no processo de transferência de massa nesta fase é praticamente insignificante quando comparada à fase.¹⁹

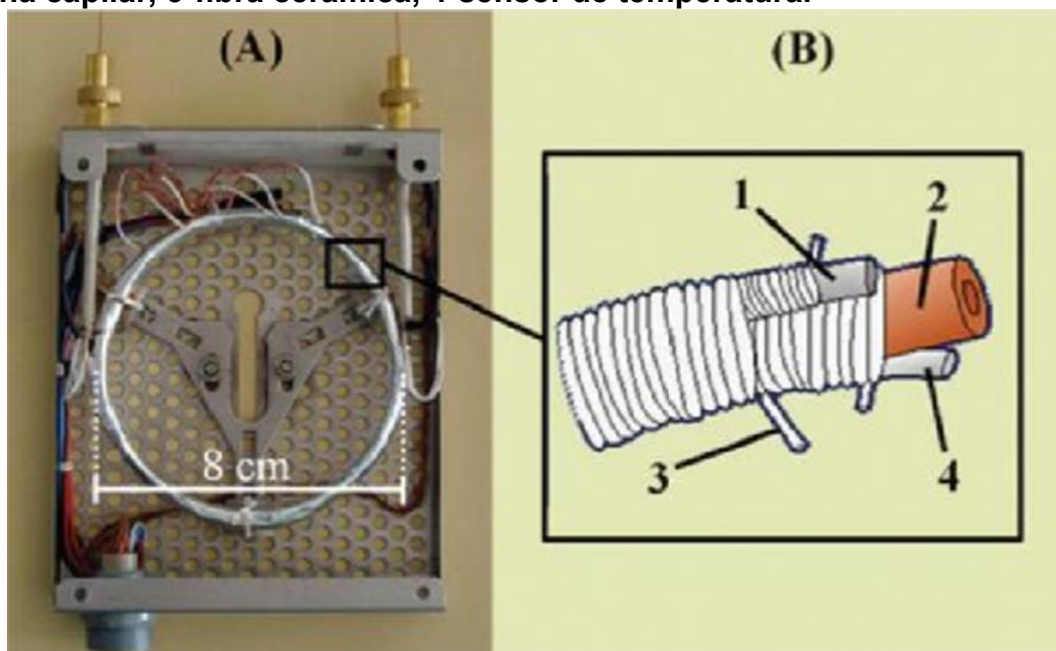
3.5.6 Sistema de Aquecimento da Coluna

Com relação às altas taxas de programação de temperatura, descrito na Tabela 6, uma das opções é a utilização de sistemas dedicados ao aquecimento, em que a coluna narrow bore é colocada no interior de um módulo ultrarrápido (UFM) (do acrônimo em inglês Ultra Fast Module), conhecido usualmente como “gaiola”.

Neste sistema, a coluna recebe calor por meio de um aquecimento resistivo. Tanto o sensor de temperatura, quanto a resistência elétrica são revestidos por uma camada de teflon, ou fibra cerâmica, constituindo um conjunto de pouca massa térmica.²⁵

A Figura 16 contém um exemplo do módulo ultrarrápido.

Figura 16 - Módulo ultrarrápido (“gaiola”) usado em CG-UR. (A) Sistema dedicado de aquecimento resistivo da coluna (Thermo Fisher Scientific Inc.®). (B) Detalhe do revestimento da coluna capilar: 1- elemento aquecedor, 2- coluna capilar, 3-fibra cerâmica, 4-sensor de temperatura.



Fonte: SEQUINEL, R. et al.,2010.²⁵

Assim, nenhum aquecimento do forno é exigido e são utilizadas as interfaces convencionais de injetor e detector do cromatógrafo convencional. O sistema modular para aquecimento permite alcançar maiores velocidades de aquecimento, em relação ao forno da CG-C. Em se tratando de CG-UR, este módulo é imprescindível para a obtenção de separações cromatográficas no limite de alguns segundos.²⁵

3.5.7 Determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos por CG-UR

Os ésteres metílicos derivados de ácidos graxos podem ser determinados por cromatografia gasosa ultrarrápida através de uma coluna carbowax, de 5m de comprimento, 0,1mm de diâmetro interno, 0,1 μm de espessura de filme, com temperatura da coluna programada inicialmente a 120°C, permanecendo por 6

segundos e elevada até 250°C, onde permanecerá por 12 segundos, com taxa de aquecimento de 1,7°C seg⁻¹. O volume injetado é de 1 µL, com razão de split 1:50. O fluxo do gás de arraste é mantido constante em 0,8 mL min⁻¹, e utiliza-se hidrogênio como gás de arraste. As temperaturas do injetor, do bloco de aquecimento e do detector estão definidas a 250°C.²⁶

Esse método foi desenvolvido por Riccardo Facchetti e Andrea Cadoppi, e pertence à Thermo Electron Corporation (empresa italiana que desenvolveu e patenteou o módulo ultrarrápido, utilizado na CG-UR). Porém o método não foi validado quanto a sua eficácia na quantificação de ésteres. Apenas foi verificada a robustez do sistema através analisando cerca de 100 amostras de óleo de peixe reais, e a sequência foi completada com cinco análises de solução padrão FAME injetados nos mesmos parâmetros analíticos. Focando principalmente na repetibilidade. Com a continuação das formas ideais de pico obtidos nesses últimos 5 padrões, provou-se que a eficiência da coluna é preservada, mesmo após inúmeras injeções de amostras reais.

3.6 Validação de métodos cromatográficos

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis.

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica.

Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado.²⁸

3.6.1 Conceitos básicos do processo de validação

A validação do método realizada nesse trabalho foi baseada no texto de Ribani, et. al.²⁸

Dentro do âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos:

O primeiro, chamado de validação no laboratório (“in house validation”), consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade. Pode-se considerar esta etapa como sendo preliminar à validação completa (“full validation”).

O segundo tipo, validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação.

Protocolos internacionalmente aceitos têm sido estabelecidos para a validação completa, mais precisamente o Protocolo Harmonizado Internacional e o procedimento ISO (“International Standard Organization”). Estes protocolos requerem um número mínimo de laboratórios e materiais testes para serem incluídos no estudo interlaboratorial para validação completa do método analítico. No Brasil os estudos de comparações interlaboratoriais são coordenados por instituições como: Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), Inmetro, ANP e outros, através do Programa Brasileiro de Metrologia em Química.²⁸

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços.

A frequência com que o método será utilizado também influencia o tipo de estudo de validação que é necessário.

Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método. Por exemplo, se um método será usado para análise quantitativa para a concentração de um composto majoritário, não há necessidade de testar e validar os limites de detecção e quantificação do método. O objetivo do método pode incluir também os diferentes tipos de equipamentos e os lugares em que o método será utilizado, ou seja, se o método é desenvolvido para ser utilizado em instrumento e laboratório específicos, não há necessidade de usar instrumentos de outras marcas ou incluir outros laboratórios nos experimentos de validação. Desta forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário.²⁸

3.6.2 Parâmetros analíticos para validação de métodos

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito.²⁸

3.6.2.1 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. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas.²⁸

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve

estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro. Estas duas maneiras são as mais utilizadas. O método de adição padrão também pode ser aplicado para os estudos de seletividade, porém este método é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. Neste caso é feita uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz. Comparam-se então as duas curvas analíticas e caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, portanto o método é seletivo.²⁸

3.6.2.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.

A relação matemática entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as linhas devem ser definidas por no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva.²⁸

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.²⁸

A ANVISA²⁹ recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO³⁰ um valor acima de 0,90.

3.6.2.3 Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas.

A precisão pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), calculado pela equação 13, onde s é o desvio padrão absoluto e $\bar{X}$ é a media dos resultados.

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (15)$$

Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um RSD de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra.²⁸

Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas. A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade.²⁸

3.6.2.3.1 Repetitividade ou repetibilidade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo. A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

Para a repetitividade, o INMETRO³⁰ recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. A ICH³¹ e ANVISA²⁹ sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado.²⁸

3.6.2.3.2 Precisão Intermediária

Indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados.

A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD).²⁸

3.6.2.3.3 Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.).

A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos que venham a se tornar uma norma técnica ou a serem incluídos, por exemplo, em farmacopeias, procedimentos do CODEX, etc.²⁸

É muito comum encontrar desacordo entre métodos analíticos. Isto aparece quando vários laboratórios analisam uma amostra em comum, em estudos colaborativos. Frequentemente, altas variações são observadas entre os resultados. Assim, os dados provenientes de apenas um laboratório não são suficientes para avaliar a reprodutibilidade do método. A documentação que apoia os estudos de precisão em nível de reprodutibilidade deve incluir estimativa do desvio padrão absoluto, estimativa do desvio padrão relativo e intervalo de confiança, calculados pelas equações de 15 a 17.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (16)$$

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{X} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (17)$$

Onde, t_{n-1} = valor crítico da distribuição de Student com $n-1$ graus de liberdade, e n é o número de medições. O valor t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança.

3.6.2.4 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza.

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa.

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência e comparação de métodos.²⁸

3.6.2.4.1 Materiais de referência certificados (CRM)

Os CRM são materiais de referência acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Os materiais de referência certificados são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como NIST (“National Institute of Standards and Technology” - USA), LGC (“Laboratory of the Government Chemist” - UK), USP, FAPAS (“Food Analysis Performance Assessment Scheme” - UK), etc.

Os valores obtidos pelo laboratório (a média e a estimativa do desvio padrão de uma série de replicatas) da mesma amostra padrão devem ser comparados com os valores certificados do material de referência, para verificar a exatidão do método.²⁸

3.6.2.4.2 Comparação de métodos

Consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois

métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência.

Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida. As análises são efetuadas em replicatas, utilizando os dois métodos em separado (o método em desenvolvimento e o método de referência), sobre as mesmas amostras, em uma faixa de concentrações em que se pretende validar o método.²⁸

3.6.2.5 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.²⁸

Esses dois parâmetros da validação não serão discutidos de maneira mais abrangente, porque o método desenvolvido nesse trabalho tem como objetivo quantificar o composto majoritário da amostra, tornando assim esses parâmetros dispensáveis para o processo de validação do método proposto.

3.6.2.6 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena em seus parâmetros.

A robustez de um método cromatográfico é avaliada em CG, por exemplo, pela variação de parâmetros como: programação da temperatura, natureza do gás de arraste, preparo de amostras.

As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos.^{28, 32}

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e Materiais

Os solventes, padrões, gases e materiais usados estão relacionados a seguir:

- n-heptano 99,5% P.A. Marca: Vetec Química Fina. Frasco de vidro âmbar de 1L;
- Acetona 99,5% P.A. Marca: Vetec Química Fina. Frasco de vidro âmbar de 1L.
- Etanol 99,5% P.A. Marca: Sigma. Frasco de vidro âmbar de 1L;
- Hexanoato de metila (C6), octanoato de metila (C8), decanoato de metila (C10), undecanoato de metila (C11), dodecanoato de metila (C12), tetradecanoato de metila (C14), hexadecanoato de metila (C16), heptadecanoato de metila (C17), octadecanoato de metila (C18), nonadecanoato de metila (C19), eicosanoato de metila (C20), docosanoato de metila (C22), tetracosanoato de metila (C24). Todos com pureza de 99 %, marca: Nu-Check – USA;
- Hidrogênio, nitrogênio e ar sintético Todos com pureza mínima de 99,999%, marca: White Martins;
- Frasco com capacidade de 20 mL, com tampa;
- Frascos apropriados para amostrador automático (vial de 2 mL);
- Pipetas de Pasteur descartável;
- Micropipeta de 100 a 1000 µL.

4.2 Equipamentos

- Cromatógrafo a gás Thermo Trace GC Ultra, equipado com amostrador automático Tri-Plus, detector FID com alta frequência de aquisição de dados, e módulo de aquecimento ultrarrápido.
- Balança analítica com resolução de 0,0001 g. Marca: Toledo do Brasil. Certificado de calibração nº BA 043_12_12, data de emissão: 07/01/2013, válido até 17/04/2014.

4.3 Análises Cromatográficas

O equipamento utilizado na análise cromatográfica para amostras de biodiesel está representado na Figura 17.

A coluna cromatográfica capilar empregada foi a VF23MS da Thermo Fisher Scientific Inc., com aplicabilidade para análise de FAMES. Apresenta fase polar, 70% *cyanopropyl polysilphenylene – siloxane*.³³ E suas características são: 10m de comprimento, 0,2 μ m de espessura do filme e 0,1mm de diâmetro interno. O detector usado foi o FID e sua temperatura foi fixada em 250°C. Os gases utilizados pelo detector foram o hidrogênio, fluxo de 45mL min⁻¹, ar sintético a 350mL min⁻¹ e como make-up gás nitrogênio, 30mL min⁻¹. O injetor empregado foi o Split/Splitless e sua temperatura foi mantida em 250°C. O volume de amostra injetado foi de 0,5 μ L, com uma seringa de 5 μ L, no modo de injeção Split com razão de 1:100.

As condições da coluna foram ajustadas com temperatura inicial de 60 °C, mantida por 0,10 min, e elevada até 180°C, mantido por 0,2min, em uma taxa de 300 °C min⁻¹. A temperatura foi elevada novamente até 250°C, a uma taxa de aquecimento de 500°C min⁻¹ e mantido por 0,66 min. Foi utilizado hidrogênio como gás de arraste, e seu fluxo foi mantido constante em 1,0mL min⁻¹. Essas condições foram determinadas durante o desenvolvimento do método ultrarrápido. Com o equipamento trabalhando nessas condições foram obtidos os melhores resultados.

Figura 17 - Módulo ultrarrápido montado no cromatógrafo a gás utilizado.



Fonte: MUNHOZ, J. F. V. L., 2013.¹⁹

4.4 Preparação das Amostras

A preparação da amostra foi realizada conforme descreve a norma técnica NBR 15764.

Foram adicionados aproximadamente 0,1000 g da amostra em frasco de 20 mL e a massa medida foi registrada. Para cada 0,1000g da amostra deve-se adicionar 7,000g de n-heptano e a massa total registrada. A massa de heptano foi corrigida em função da massa de amostra medida de acordo com a equação 16. A mistura foi homogeneizada e transferida para o frasco do amostrador automático.

$$m_{heptano} = m_{amostra} \times \frac{7,0000g}{0,1000g} \quad (16)$$

4.5 Preparação da Curva Analítica

A curva analítica foi construída utilizando o octadecanoato (C18) de metila como padrão analítico. Para análise de amostras de biodiesel em que há predominância significativa de ésteres com cadeias carbônicas menores que C14, a curva analítica pode ser construída utilizando dodecanoato (C12) de metila. No caso de uma distribuição equilibrada entre ésteres de cadeia curta e longa podem ser construídas duas curvas analíticas independentes. Isso se deve, pelo fato de que os compostos orgânicos de cadeias menores apresentam maior intensidade dos picos em relação aos compostos de maior cadeia carbônica detectados pelo FID.¹⁷

Para cada 0,1000g do padrão devem ser adicionados 7,0000g do solvente n-heptano, considerando que 0,1000g do padrão correspondem a 100% de teor total de éster.

Para preparar as diferentes concentrações da curva, foram medidas as massas do padrão correspondente a sua porcentagem em massa, e essa foi completada até 0,1000g com etanol. Para cada 0,1000g dessa solução foram adicionados 7,0000g de n-heptano. Na Tabela 7 consta a relação das soluções correspondentes aos pontos da curva, bem como sua preparação.

Tabela 7. Massas teóricas utilizadas no preparo das soluções padrão de octadecanoato de metila.

Ponto	[] m/m (%)	Massa Teórica C18 /g	Massa teórica etanol /g	Massa teórica de n- heptano /g
1	20	0,0200	0,0800	7,0000
2	40	0,0400	0,0600	7,0000
3	60	0,0600	0,0400	7,0000
4	80	0,0800	0,0200	7,0000
5	95	0,1900	0,0100	14,0000

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

O ponto 5 da curva é preparado com o dobro de massa para cada componente com a finalidade de facilitar a pesagem do etanol, pois massas muito pequenas estão susceptíveis a erros maiores na pesagem.

A solução correspondente a cada ponto deve ser injetada em triplicata no cromatógrafo, e as áreas dos picos obtidos devem ser somadas (é importante verificar se os valores das áreas dos cromatogramas são comparáveis entre si, visto que variações influenciam na precisão dos resultados).

A curva analítica é obtida, traçando-se um gráfico da somatória das áreas no eixo das ordenadas e percentual do analito no eixo das abscissas.

4.6 Expressão dos Resultados

Deve-se calcular o teor total dos ésteres utilizando a equação 19, onde:

- C é a concentração total dos ésteres presentes na amostra, expressa em porcentagem massa por massa (% m/m);
- A é o somatório das áreas dos ésteres presentes na amostra;
- b é o coeficiente linear obtido para a curva analítica;
- a é o coeficiente angular obtido para a curva analítica.

$$C = \frac{A - b}{a} \quad (19)$$

5 RESULTADOS

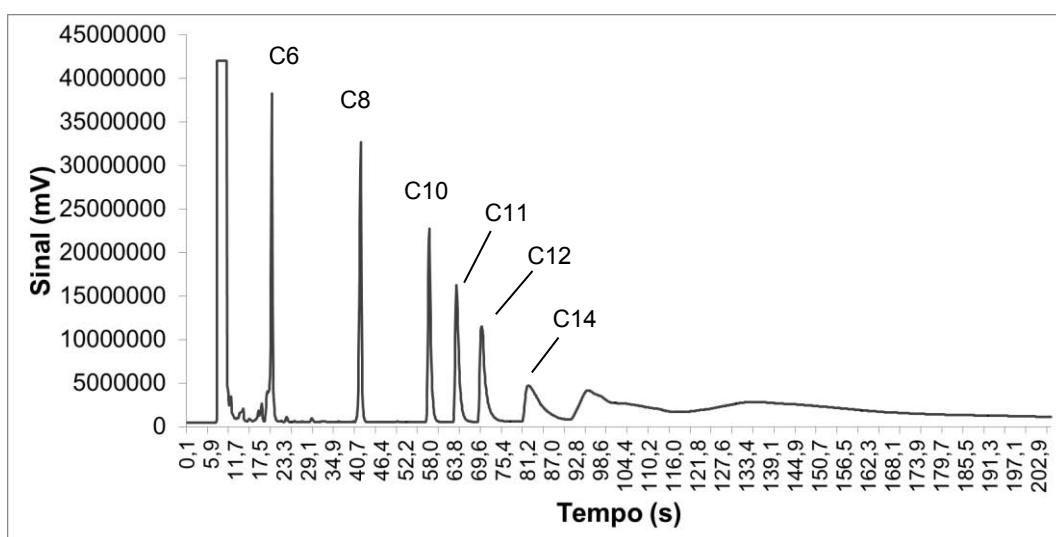
5.1 Desenvolvimento do Método Cromatográfico

(Método 1) Inicialmente, utilizando uma coluna UFC WAX de 5 m de comprimento, 0,1 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,2 μm . Possui fase polar, polyethylene glycol. Decidiu-se usar essa coluna porque era a que tínhamos disponível no laboratório, e inclusive já instalada ao equipamento, e é indicada para análises de aromáticos, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas, além de análises ambientais e petroquímicas, e de sabores e fragrâncias.^{33, 34}

Foi injetada uma mistura de padrões de C6 a C24 (C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C19:0, C20:0, C22:0, C22:1, C24:0 e C24:1), com um fluxo constante de gás de arraste de 0,8 mL min^{-1} . A temperatura da coluna foi programada em 100°C, mantendo por 0,50 min, até 240°C, mantendo por 2,00 min, com uma taxa de aquecimento de 150°C min^{-1} . O volume de amostra injetado foi de 0,1 μL com taxa de *split* de 1:200.

Esse método foi capaz de separar com qualidade os ésteres de cadeia até 12 carbonos, como mostra a Figura 18.

Figura 18 - Perfil cromatográfico obtido pelo Método 1 para mistura de ésteres por CG-UR.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

Entretanto, notou-se que a eficiência de separação não foi boa para os componentes maiores que C14, e não permitindo a visualização de pelo menos os principais ésteres de uma amostra de biodiesel de soja real.

No caso do biodiesel de soja, por exemplo, a maior parte de seus ésteres constituintes apresenta cadeias carbônicas entre 16 a 22 carbonos, como mostrado na Tabela 8. Portanto essa é a faixa de maior interesse na separação cromatográfica.

Tabela 8. Composição química em ácidos graxos do óleo de soja.

Ácido graxo	Número de carbonos	Contribuição percentual (%)
Ácido palmítico	(C16:0)	2-3
Ácido esteárico	(C18:0)	2-6
Ácido oleico	(C18:1)	18-31
Ácido linoleico	(C18:2)	49-57
Ácido linolênico	(C18:3)	2-10,5
Ácido erúico	(C22:1)	0-0,5

Fonte: GASPARINI, F. 2010.

Com o intuito de melhorar a separação dos ésteres de cadeias maiores, três novos métodos foram testados (Métodos 2, 3 e 4). Variando entre eles o fluxo do gás de arraste e a razão de Split, com o intuito de verificar se um maior fluxo do gás de arraste ou um aumento gradual do fluxo seria suficiente para promover uma melhor eficiência da separação. E se o aumento da razão de *Split*, promovendo uma menor quantidade de analito na coluna, seria vantajoso de forma a facilitar o processamento dos componentes pela coluna capilar.

A tabela abaixo mostra os valores de fluxo do gás de arraste e a razão de Split utilizada nos métodos de 2 a 4.

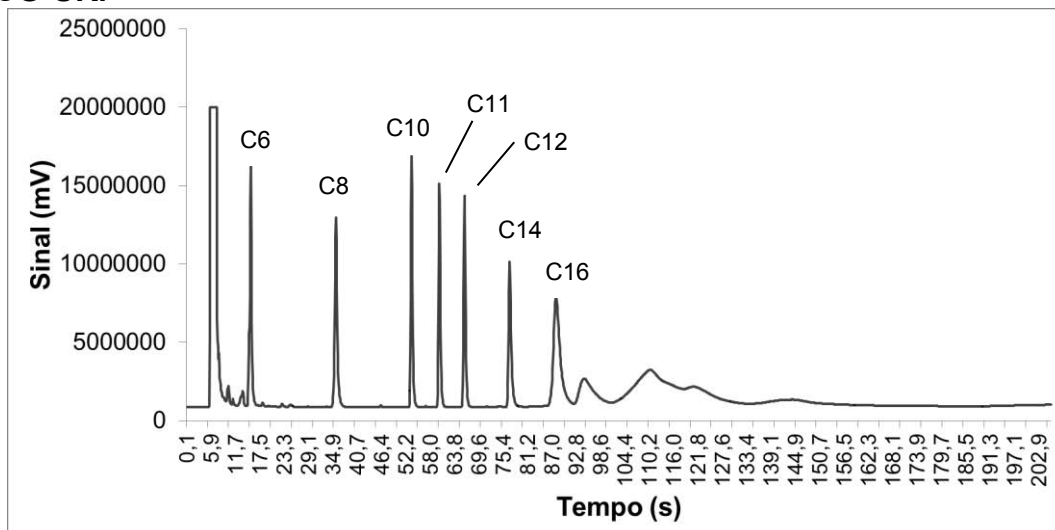
Tabela 9. Variações no fluxo do gás de arraste e na razão de *Split* para os métodos 2, 3 e 4.

	Método 2	Método 3	Método 4
Fluxo do gás de arraste	Constante (1,2 mL min ⁻¹)	Programado (1,2 mL min ⁻¹ por 1,30 min; taxa de 1,0 mL min ⁻² até 1,4 mL min ⁻¹)	Programado (1,2 mL min ⁻¹ por 1,30 min; taxa de 1,0 mL min ⁻² até 1,8 mL min ⁻¹)
Razão de Split	1:300	1:200	1:200

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

Com o aumento do fluxo houve uma melhora na eficiência do método, que por vez apresentou capacidade de separar dois novos picos (Figura 19), os quais foram identificados como sendo os ésteres C14 e o C16. Porém, como mostrado na Tabela 8, é interessante que o método separe até o éster C22.

Figura 19 - Perfil cromatográfico obtido pelo Método 2 para mistura de ésteres por CG-UR.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

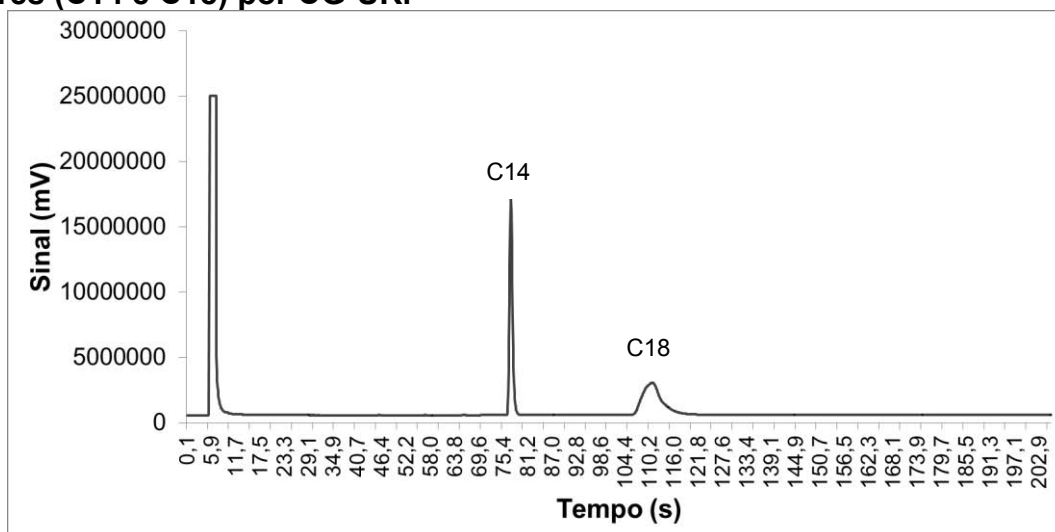
Para se fazer a verificação dos métodos com o fluxo do gás de arraste em gradiente (métodos 3 e 4) substituiu a mistura de padrões utilizados até então, pela mistura de um éster de cadeia menor (C14), que já foi separado pelo método

anterior, e um outro de cadeia maior (C18), que ainda não foi identificado no cromatograma. Essa medida foi tomada para evitar saturação da coluna pelos ésteres mais pesados, uma vez que o objetivo desse teste foi apenas verificar se com o fluxo em gradiente seria possível obter um pico referente a um éster de cadeia carbônica maior que C16.

O Método 3 gerou o cromatograma representado pela Figura 20, no qual foi possível identificar o pico de C18, porém com resolução de baixa qualidade.

A partir desse ponto já podemos perceber que o aumento do fluxo não será capaz de efetuar a separação dos ésteres na faixa desejada. Assim um último teste foi feito trabalhando com essa variável, a fim de verificar pelo menos uma melhora da resolução do pico referente ao C18.

Figura 20 - Perfil cromatográfico obtido pelo Método 3 para uma mistura de ésteres (C14 e C18) por CG-UR.

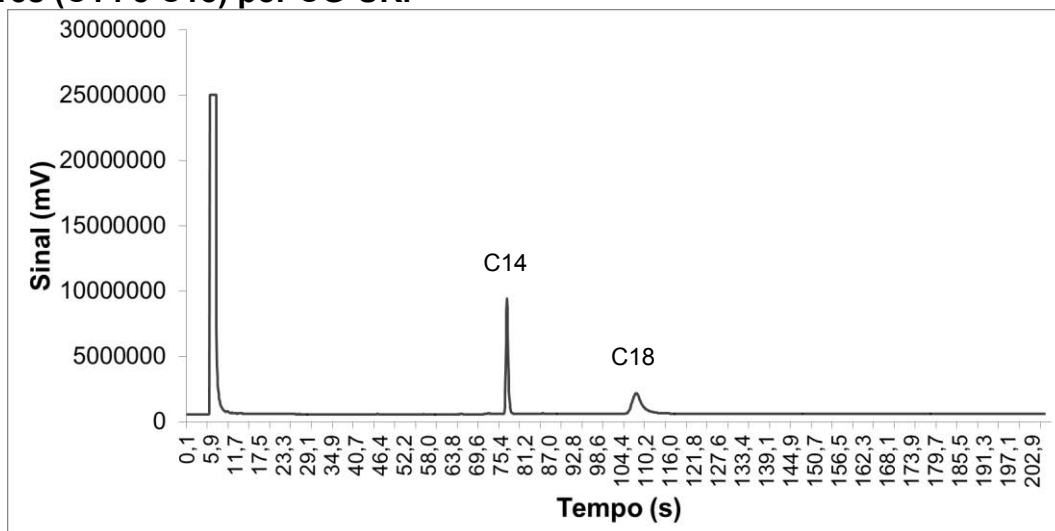


Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

Para esse teste foram utilizadas as mesmas condições Método 1. O fluxo do gás de arraste foi mantido constante em $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ durante 1,30 minutos, depois ele foi elevado até $1,8 \text{ mL min}^{-1}$, com uma taxa de $1,0 \text{ mL min}^{-2}$, e esse valor foi mantido constante até o final da corrida (Método 4).

A Figura 21 refere-se ao Método 4, e mostra uma pequena melhora da resolução do pico referente ao C18, em relação ao obtido pelo Método 3.

Figura 21 - Perfil cromatográfico obtido pelo Método 4 para uma mistura de ésteres (C14 e C18) por CG-UR.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

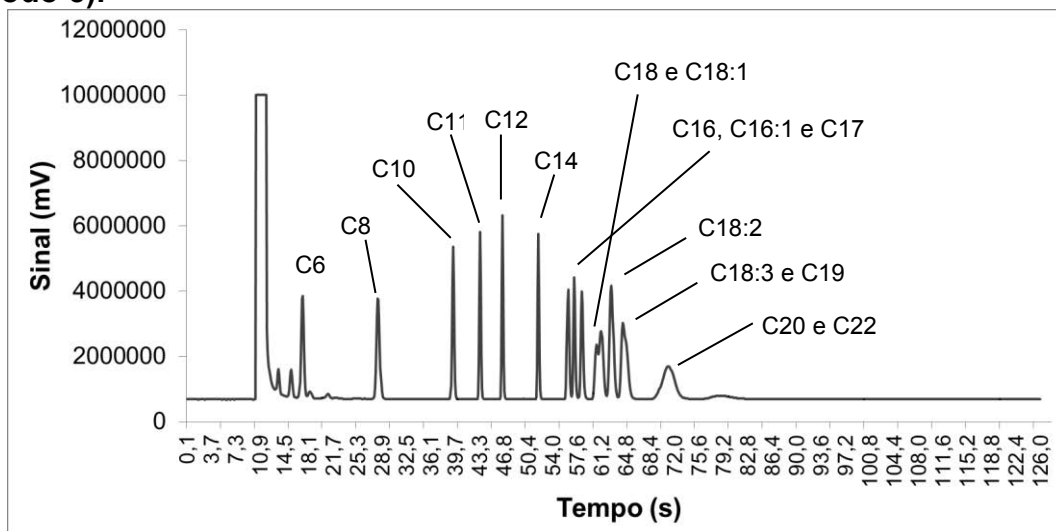
Dessa forma novos testes devem ser realizados, trabalhando outras variáveis, como novas rampas de temperatura, ou uma nova coluna.

A coluna capilar de fase estacionária com diferente polaridade da utilizada até então, é uma variação considerável, pois altera a seletividade (α) da análise cromatográfica, onde a interação dos ésteres de cadeia longa com a coluna deve ser menor, melhorando assim a resolução dos picos e permitindo a saída desses ésteres.

Com este intuito foi realizada uma busca pelos catálogos da Thermo® para propor outra coluna que provavelmente apresentaria melhor eficiência. Verificou-se que a coluna VF23MS de 10 m de comprimento, 0,15 mm de diâmetro interno e 0,15 μm de espessura do filme, possui fase polar, 70% *cyanopropyl polysilphenylene – siloxane*, tem maior capacidade de aquecimento em comparação a outras colunas de polaridade equivalente (até 260°C), e apresenta aplicabilidade para análise de FAMES.³³

Desse modo foi feita a compra dessa coluna e para testa-la utilizou-se das mesmas condições descritas para o Método 1 (apenas a taxa de Split e a vazão do gás de arraste foram elevados). O novo método, utilizando a coluna capilar VF23MS foi chamado de Método 5.

Figura 22 - Perfil cromatográfico de mistura de ésteres obtido por CG-UR. injetor *Split / Splitless* e detector FID mantidos a 250°C, gás de arraste hidrogênio com um fluxo constante de 1,2 mL min⁻¹. A corrida cromatográfica foi realizada com temperatura programada de 100°C, mantendo por 0,40 min, até 250°C, mantendo por 1,10 min, com uma taxa de aquecimento de 250°C min⁻¹. O volume de amostra injetado foi de 0,1µL com taxa de *Split* de 1:400 (método 5).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

O resultado obtido pelo Método 5, apresentado na Figura 22 foi animador, e apresentou de imediato uma grande melhora na resolução em comparação aos resultados adquiridos com a coluna anterior. Tornou-se possível a identificação de ésteres de cadeia maior, como C17, C18 e outros (C18:1, C18:2, C18:3 C19 e C20). Essa melhora se deu devido a coluna VF23MS possuir maior seletividade para o anlito em questão quando comparada a coluna WAX. O aumento da seletividade aumenta a resolução do cromatograma, como foi visto na Equação 12 da pág. 30.

Mesmo com o bom resultado, se teve o interesse em variar a rampa de aquecimento, pois essa se manteve constante durante todo o desenvolvimento do método. Uma rampa mais apropriada pode melhorar a resolução de picos alargados.

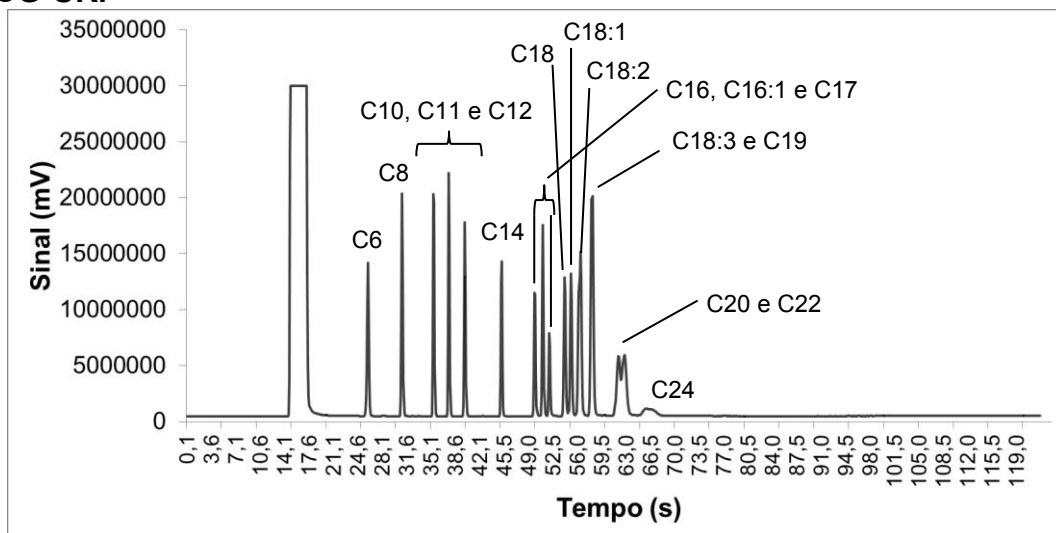
Sendo assim foi dado início a busca de possíveis rampas de aquecimento para métodos por CG-UR na literatura, foi percebido que na grande maioria das vezes apresentam os intervalos de temperatura bastante parecidos com os da cromatografia convencional, variando apenas o tempo de permanência em determinada temperatura, e a taxa de aquecimento.³⁵

Com base nessa referência, decidiu-se construir uma rampa de aquecimento com programação de temperatura semelhante à programação utilizada pela norma EN 14103.

Segundo a norma EN 14103 a temperatura da coluna deve se iniciar a 60°C e permanecer por 2 minutos, depois se elevar até 200°C com uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ e para 240°C com taxa de aquecimento de 5°C min⁻¹, e o fluxo na coluna pode variar entre 1 e 2 mL min⁻¹. Temperatura do injetor e do detector de 250°C.

A nova rampa de aquecimento deu origem ao Método 6, com as seguintes condições cromatográficas: injetor *Split / Splitless* e detector FID mantidos a 250°C, gás de arraste hidrogênio com um fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. A corrida cromatográfica foi realizada com temperatura programada de 60°C, mantendo por 0,10 min, até 180°C, com taxa de aquecimento de 300°C min⁻¹, mantendo por 0,20 min, a temperatura foi elevada novamente até 250°C, com taxa de aquecimento de 500°C min⁻¹, mantendo por 1,20 min. O volume de amostra injetado foi de 0,1µL com taxa de Split de 1:300.

Figura 23 - Perfil cromatográfico obtido pelo Método 6 para mistura de ésteres por CG-UR.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

A resposta do método representada na Figura 23 apresentou uma melhor separação em relação ao método anterior. Como pode ser observado ocorreu a separação dos compostos C18:0 e C18:1, que estavam coeluidos em um mesmo

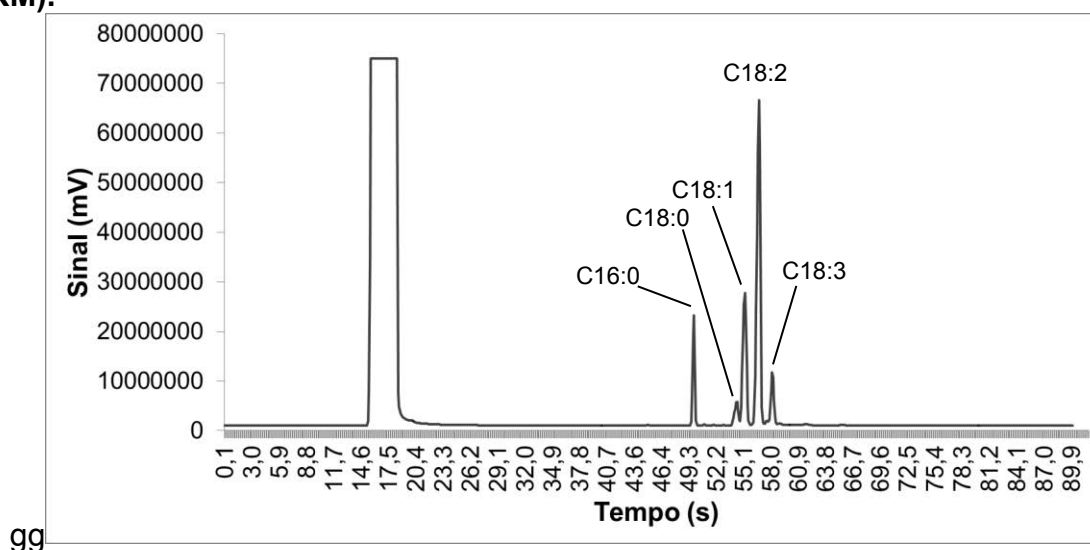
pico, e também um desdobramento do penúltimo pico, indicando a presença dos ésteres C20, e C22.

Quando comparados os cromatogramas obtidos pelos métodos 5 e 6, podemos observar também que houve um melhoramento na eluição dos picos mais voláteis (cadeias menores), e isso se deve a diminuição da temperatura inicial, que permitiu uma maior interação desses compostos com a fase estacionária.

O Método 6 foi o que apresentou melhor resolução. O avanço adquirido durante todo o desenvolvimento foi suficiente para permitir que esse método seja utilizado na quantificação do teor total de ésteres.

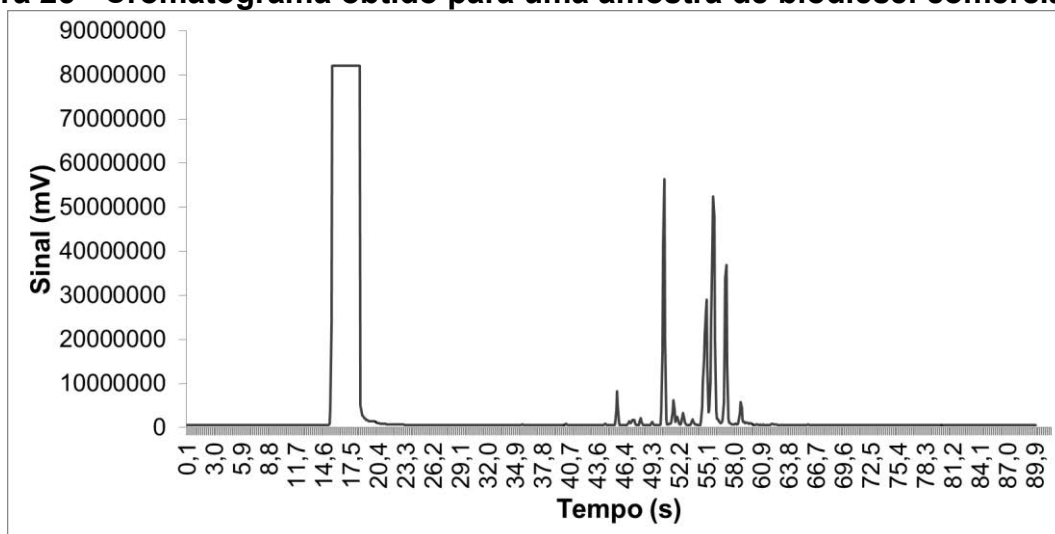
As figuras a seguir, Figura 24 e Figura 25, trazem o perfil cromatográfico obtido pelo método para uma amostra de biodiesel de soja puro (CRM), e outra para uma amostra de biodiesel comercial (blend soja/sebo).

Figura 24 - Cromatograma obtido para uma amostra de biodiesel de soja puro (CRM).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

Figura 25 - Cromatograma obtido para uma amostra de biodiesel comercial.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

5.2 Construção da curva Analítica

Para a construção da curva, é importante determinar a concentração do padrão a ser preparado, e ajustar condições como volume de injeção e taxa de *Split* de forma que a área obtida para o padrão referente a 100% tenha a melhor intensidade possível sem que venha a ultrapassar a escala no cromatograma.

Com o intuito de facilitar a preparação das soluções padrão decidiu-se utilizar em concentrações mais baixas, semelhante à utilizada pela norma NBR 15764, até porque dessa maneira seria possível preparar uma única amostra, e analisa-la pelos dois métodos. O volume de injeção foi aumentado para 0,5 μL de forma a minimizar variações causadas pela injeção, já que a seringa disponível e utilizada foi de 10 μL . E a taxa de *Split* que melhor se ajustou a essas condições de concentração e volume foi de 1:100.

Portanto, o método cromatográfico utilizado na construção da curva analítica apresenta as seguintes condições: injetor *Split / Splitless* e detector FID mantidos a 250°C, gás de arraste hidrogênio com um fluxo constante de 1,0 mL min^{-1} . Temperatura programada de 60°C, mantendo por 0,10 min, até 180°C, com taxa de aquecimento de 300°C min^{-1} , mantendo por 0,20 min, a temperatura foi elevada novamente até 250°C, com taxa de aquecimento de 500°C min^{-1} , mantendo por 1,20 min. Volume de amostra injetado de 0,5 μL com taxa de *Split* de 1:100.

Essas condições cromatográficas além de serem utilizadas para a construção da curva analítica, também foram empregadas na análise de todas as amostras.

A Tabela 10 mostra a preparação das soluções padrão que constituem a curva analítica, construída com 5 pontos, sendo o ponto X um ponto de verificação.

Tabela 10. Curva analítica teor total de ésteres (C18).

Ponto	[] m/m (%)	Massa Teórica C18 /g	Massa teórica etanol /g	Massa real C18 /g	Massa real etanol /g	Massa solução /g	Massa teorica Heptano /g	massa real heptano /g	[] real m/m (%)
1	20	0,0200	0,0800	0,0211	0,0804	0,1015	7,1050	7,1168	20,79%
2	40	0,0400	0,0600	0,0406	0,0616	0,1022	7,1540	7,1610	39,73%
3	60	0,0600	0,0400	0,0597	0,0394	0,0991	6,9370	6,9346	60,24%
4	80	0,0800	0,0200	0,0809	0,0206	0,1015	7,1050	7,1495	79,70%
5	95	0,1900	0,0100	0,1961	0,0155	0,2116	14,8120	14,8156	92,67%
X	-	-	-	0,0756	0,0342	0,1098	7,6860	7,6904	68,85%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

Cada amostra (ponto) foi injetada no cromatógrafo em triplicata, e a média das áreas obtidas foi utilizada para a construção da curva. A tabela a seguir (Tabela 11) mostra os resultados para cada amostra injetada.

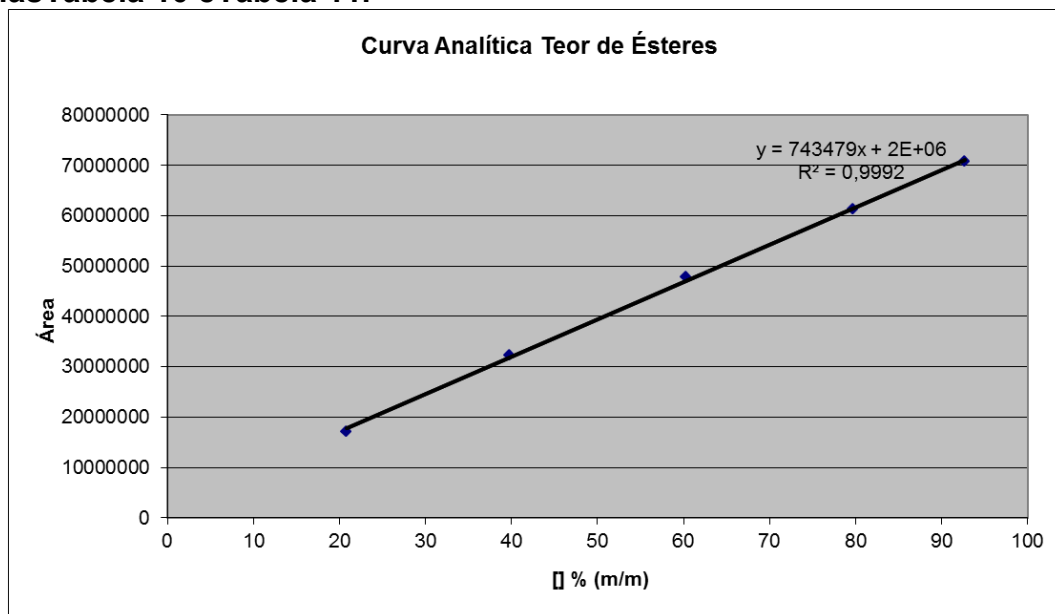
Tabela 11. Área dos pontos da curva analítica.

Pontos	Área dos Picos	Média das Áreas	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
1-a	17053691	17081850	139843,2146	0,818665511
1-b	17233630			
1-c	16958229			
2-a	32482129	32250616,33	202205,5173	0,62698187
2-b	32108621			
2-c	32161099			
3-a	48068735	47874726,33	181814,6737	0,379771724
3-b	47847199			
3-c	47708245			
4-a	61091709	61253221,67	422755,0936	0,690176095
4-b	60935033			
4-c	61732923			
5-a	70703393	70826347	828732,1976	1,170090274
5-b	71709687			
5-c	70065961			
X-a	53366269	52895590,33	1225681,69	2,317171776
X-b	53816167			
X-c	51504335			

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

Tendo em mãos a concentração real de cada ponto da curva e sua respectiva área, construiu-se um gráfico da área em função da concentração, gerando a curva analítica representada na Figura 26.

Figura 26 - Curva analítica construída a partir dos resultados mostrados nas tabelas Tabela 10 e Tabela 11.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

Para fazer a verificação da curva, foi utilizada a área correspondente ao ponto X. Sua concentração foi calculada através da equação da reta, e essa comparada com a concentração real, que é conhecida.

$$C = \frac{A - 2 \times 10^6}{743479} = \frac{52895590,33 - 2 \times 10^6}{743479} = 68,45598912$$

Comparando o resultado real com o calculado, podemos dizer que são bastante próximos, com baixo erro relativo percentual (ER) entre seus valores. O que indica que a curva analítica apresenta boa resposta analítica.

$$ER = \frac{|R_{exp.} - V_{ref.}|}{V_{ref.}} \times 100\% \quad (20)$$

$$ER = \frac{|68,45 - 68,85|}{68,85} \times 100\% = 0,58\%$$

Onde, $R_{exp.}$ é o resultado obtido experimentalmente, e $V_{ref.}$ é o valor de referência.

5.3 Validação do Método

5.3.1 Seletividade

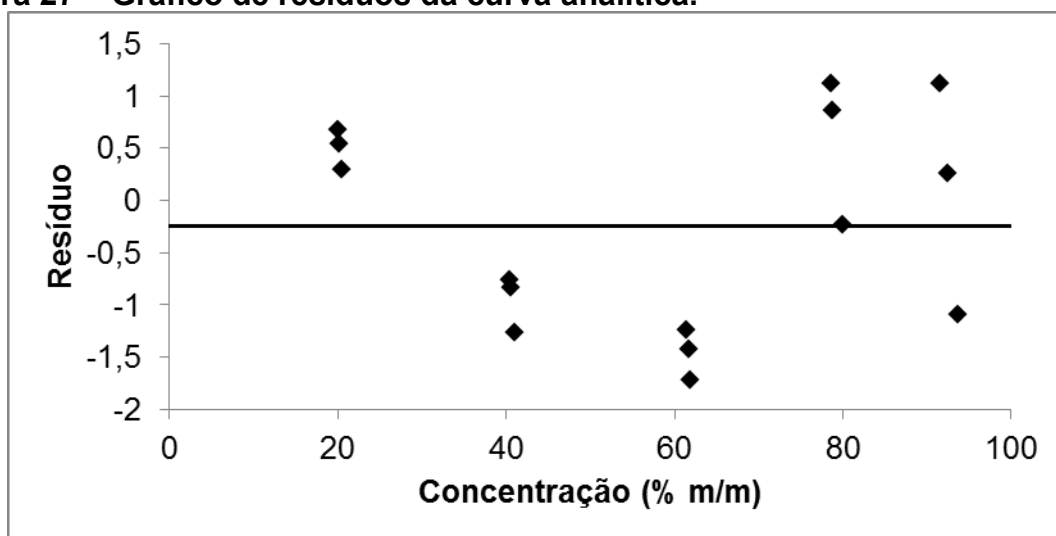
Para esse caso em especial, onde a intenção é quantificar o teor total dos ésteres, não há necessidade de avaliar a seletividade do método, pois todos os picos apresentados serão incorporados ao cálculo da concentração. Além de o detector utilizado não detectar outros tipos de interferentes que possam estar contidos no biodiesel analisado.

5.3.2 Linearidade

A Figura 26, apresentada na página 72 mostra a regressão linear da curva analítica com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9996, o que pode ser considerado como evidência de um ajuste quase perfeito dos dados na linha de regressão.

Para verificar se os erros obtidos pela medição da curva analítica são aleatórios, foi construído um gráfico de resíduos (Figura 27). O gráfico foi construído a partir da diferença entre os valores reais dos padrões injetados, e os valores calculados pela equação da curva em função da concentração real.

Figura 27 – Gráfico de resíduos da curva analítica.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

O gráfico apresentou os pontos de forma aleatória, confirmando a linearidade da curva analítica. Porém a diferença entre os resíduos parece aumentar com o aumento da concentração, colocando em questionamento a homocedasticidade da curva analítica. Se a curva for homocedástica significa que a curva apresenta a mesma variância para os resultados independente da concentração da amostra, descartando qualquer tendência nos resultados, se for heterocedástica a variância é maior dependendo da concentração da amostra, e apresenta algum tipo de tendência em seus resultados, que pode ser eliminada realizando uma ponderação dos dados.

Afim de confirmar que a homocedasticidade da curva analítica realizou-se o teste de Fisher (Teste F) que correlaciona a variância entre dois grupos amostrais. O teste foi feito comparando a variância obtida para o ponto de 20% da curva com todos os outros pontos (40, 60, 80 e 95%). A Tabela 12 mostra os resultados para o teste:

Tabela 12. Teste de Fisher

	Crítico Uni-Caldal	40%	60%	80%	95%
F	19	2,09	1,69	14,35	35,11

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

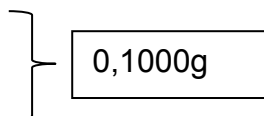
Quando o valor do Teste F é menor que o valor crítico uni-caldal ($F < F_{\text{crítico}}$) dizemos que é válida a hipótese de que as variâncias são iguais para ambas as variáveis. Assim se pode afirmar que as variâncias entre os pontos da curva referentes a 20, 40, 60 e 80% são iguais, e a curva é homocedástica até uma concentração de 80%.

5.4 Precisão

Toda determinação de concentração de amostra foram feitas por extrapolação da curva analítica. Uma vez que a curva foi construída variando entre 20 e 95% e as amostras quantificadas possuem mais de 95% em teor de ésteres.

Porém uma maneira de não quantificar por extrapolação, e fazer com q o resultado caia no intervalo homocedástico da curva é preparar a solução de amostra a ser injetada com metade de sua concentração:

- 0,0500g de amostra
- 0,0500g de etanol
- 7,0000g de heptano para cada 0,1000g da mistura amostra/etanol.



Faça a interpolação da área obtida na curva analítica e multiplique o resultado por um fator de 2, para encontrar a concentração da amostra de biodiesel.

5.4.1 Repetitividade

Para a verificação desse parâmetro 9 medições foram realizadas para uma mesma amostra, e seu resultado expressado pelo desvio padrão relativo entre essas medições. As amostras foram preparadas da forma descrita no item 4.4, da página 58. Os resultados estão contidos na Tabela 13.

Segundo Ribani, et.al. métodos que quantifiquem compostos em macro quantidades, como é o caso, requerem um RSD entre 1% e 2%.²⁷

Tabela 13. Repetitividade do método.

Nome da Amostra	Repetição	Somatória das Áreas	Concentração [] %(m/m)
Material de Referência certificado NIST 2772 Base Soja	1	75211438	98,47142690
	2	76157157	99,74344534
	3	75628231	99,03202511
	4	75204775	98,46246498
	5	76804828	100,6145809
	6	75910585	99,41179912
	7	74546807	97,57747966
	8	74172784	97,07440829
	9	76070625	99,62705739
Média	-	75523025,56	98,89052086
Desvio Padrão	-	827707,7536	1,113290024
Desvio Padrão Relativo (%)	-	1,095967419	1,125780322

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

5.4.2 Precisão Intermediária

Assim como a repetitividade é avaliada pelo RSD.

A Tabela 14 traz os resultados obtidos para a avaliação da precisão intermediária. Para sua obtenção foram realizados ensaios de uma mesma amostra em cinco dias diferentes, escolhidos aleatoriamente durante o período de três semanas. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

O RSD calculado apresentou valor abaixo de 1%.

Tabela 14. Precisão intermediária do método.

Nome da Amostra	Repetição	Média da Somatória das Áreas	Concentração [] %(m/m)
Material de Referência certificado NIST 2772 Base Soja	Dia 1	75591529,67	98,9826608
	Dia 2	75830672,5	99,30431458
	Dia 3	76221924,5	99,83055944
	Dia 4	75025509	98,22134721
	Dia 5	75237405,33	98,50635369
Média	-	75581408,2	98,96904714
Desvio Padrão	-	474304,2691	0,637952476
Desvio Padrão Relativo (%)	-	0,627540926	0,644597978

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

5.5 Exatidão

A priori a avaliação da exatidão foi realizada através do uso de um material de referência NIST (*National Institute of Standards and Technology – USA*), onde a média e o desvio padrão de uma série de replicatas da mesma amostra padrão devem ser comparados com os valores certificados do material de referencia. Essa comparação é feita através do calculo do erro relativo percentual (ER, equação 20) e erro normalizado (EN, equação 21).

O material de referencia de biodiesel de soja utilizado certifica que o valor para o teor total dos ésteres é de $100,90 \pm 1,33\%$.

Já o resultado obtido experimentalmente para o mesmo material de referencia através do método cromatográfico desenvolvido foi de $98,89\% \pm 2,67$ (média dos resultados obtidos na Tabela 13 $\pm$ a incerteza expandida calculada para a média).

$$ER = \frac{|98,89 - 100,90|}{100,90} \times 100 = 1,99\%$$

O ER foi baixo, menor que 2%, então podemos afirmar que é pequena a diferença entre os resultado obtido e o valor experimental, confirmando a exatidão do método.

O erro normalizado inclui em seu calculo a incerteza expandida fornecida pelo material de referencia e a calculada para a média dos ensaios realizados.

$$EN = \frac{|R_{exp.} - V_{ref.}|}{\sqrt{U_{exp.}^2 + U_{ref.}^2}} \quad (21)$$

$$EN = \frac{|98,89 - 100,90|}{\sqrt{2,67^2 + 1,33^2}} = 0,674$$

Onde, $R_{exp.}$ é o resultado obtido experimentalmente; $V_{ref.}$ é o valor de referência; $U_{exp.}$ é a incerteza expandida da medida experimental; e $U_{ref.}$ é a incerteza expandida do valor de referência. Seu resultado foi um valor numérico menor que um ($EN < 1$), o que permite concluir que a determinação realizada está compatível em relação ao valor de referência.

A incerteza expandida (U_{exp}) foi calculada pela correlação dos erros de medição envolvidos em todo processo. Foram incluídos ao cálculo: incerteza de repetibilidade da balança utilizada na preparação dos padrões e amostras (que esta contido em seu certificado de calibração), a incerteza do padrão utilizado na construção da curva analítica, e a incerteza combinada das pesagens efetuadas para o padrão, o solvente e a amostra.

5.6 Robustez

Para a avaliação da robustez foi elaborado um planejamento experimental.

O planejamento foi realizado em dois níveis (+1 e -1), variando quatro parâmetros:

- Ti: Temperatura inicial;
- R1: Primeira rampa de aquecimento;
- R2: Segunda rampa de aquecimento;
- F: Fluxo do gás de arraste.

A Tabela 15 detalha a variação dos parâmetros nos níveis +1 e -1.

Tabela 15 – Planejamento Fatorial em dois níveis variando quatro parâmetros.

	Parâmetros			
Nível	Ti / °C	R1 / °C min ⁻¹	R2 / °C min ⁻¹	F / mL min ⁻¹
+1	65	310	510	1,1
-1	55	290	490	0,9
Método CG- UR	60	300	500	1,0

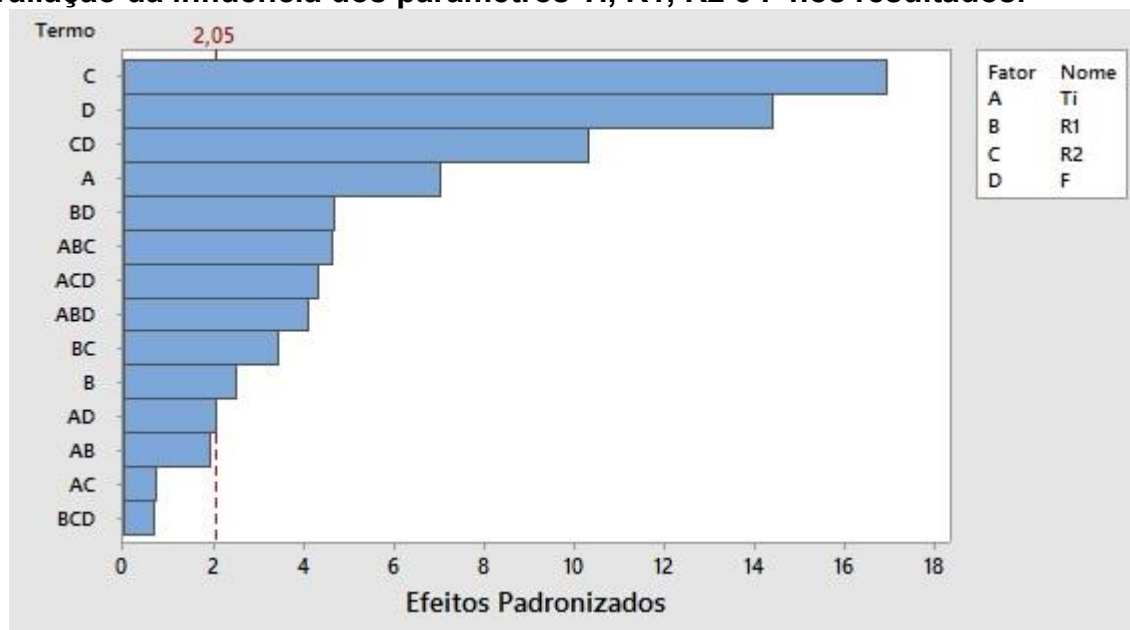
Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

O planejamento experimental fatorial resultou em 16 combinações possíveis (2^4) cada combinação foi analisado em triplicata, gerando 48 análises.

Foi utilizado como analíto uma solução padrão de C18. A mesma solução foi utilizada para todas as 48 análises, e com os resultados emitidos foi construído, com o auxílio do *software* minitab 17[®], o gráfico de Pareto que demonstra a importância de cada parâmetro na expressão do resultado, assim como se esse é significativo ou não para a obtenção do resultado.

O gráfico de Pareto está representado na Figura 28. A linha tracejada é a linha de significância, portanto todos os parâmetros e suas combinações que excedem o valor da linha são considerados de influência significativa para a expressão do resultado de análise.

Figura 28 – Gráfico de Pareto, com intervalo de confiança de 95%, para a avaliação da influência dos parâmetros Ti, R1, R2 e F nos resultados.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

5.7 Recuperação

Para a avaliação da recuperação foram preparadas três amostras com a adição de 0,5; 2,0 e 5,0% de padrão do éster C18, a fim de verificar se a resposta do cromatógrafo seria proporcional à variação causada na concentração da amostra.

Para a preparação dessas amostras foi utilizada a uma solução de C18 a uma concentração de 10,1 mg/g. As massas medidas estão contidas na Tabela 16.

Tabela 16. Preparação das amostras para avaliação da Recuperação.

	Massa de Amostra (g)	Massa de solução de C18 (g)	Massa de n-heptano (g)
Am + 0,5%	0,1072	0,0532	7,4579
Am + 2,0%	0,1156	0,2007	7,8152
Am + 5,0%	0,1094	0,5070	7,1344

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

Os resultados das concentrações obtidas para o teste de recuperação estão representados na Tabela 17.

Tabela 17. Concentração medida para amostra com acréscimos de C18.

Robustez	Triplicata	Área	Média	Concentração (% m/m)	Recuperação (%)
Am (98,69%) + 0,5%	a	76556582	77030070	100,9175377	101,74
	b	77655738			
	c	76877890			
Am (98,69%) + 2,0%	a	78433766	78863636,67	103,383736	102,67
	b	79725041			
	c	78432103			
Am (98,69%) + 5,0%	a	79888143	79680578	104,4825449	100,76
	b	79437715			
	c	79715876			

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

A avaliação da recuperação permite visualizar a sensibilidade que o método cromatográfico possui.

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O trabalho realizado permitiu concluir que:

O método ultrarrápido desenvolvido mostrou-se eficiente para a determinação do teor total de ésteres. Apresentou boa separação dos principais ésteres metílicos contidos em biodiesel de soja.

O tempo de análise é a principal vantagem apresentada nesse trabalho. O método apresentou corrida cromatográfica de 1,5 min. Que contabilizado com o tempo gasto na injeção da amostra, e para resfriamento da coluna após a análise não ultrapassam de 6 min, variando conforme o auto-amostrador utilizado.

De acordo com as figuras de mérito utilizadas para a avaliação da eficácia do método proposto foi possível concluir que:

- O método apresenta boa resposta analítica, quantificando a área do analito de maneira diretamente proporcional a sua concentração. O que foi comprovado pela linearidade da curva analítica.
- O método mostrou-se repetitivo, e reprodutivo não apresentando variações significativas entre os resultados das análises realizadas em um mesmo dia, e em dias diferentes. Isso foi confirmado através dos testes de repetitividade e precisão intermediária. O método é preciso, e pode ser empregado para análises de rotina com a vantagem de não ser necessário fazer uma nova curva analítica a cada dia que se for utiliza-lo.
- O baixo erro relativo e normalizado calculados mostraram resultados satisfatórios para a avaliação da exatidão do método. Permitindo concluir que o mesmo é exato, emitindo como resposta o valor verdadeiro da concentração de éster, ou um resultado que esteja muito próximo.
- Quanto à robustez, o método ultrarrápido desenvolvido é sensível a grandes variações, como mostrado nos ensaios feitos para determinar a robustez do método. Porém um equipamento como o utilizado não apresentará variações tão exacerbadas quanto às avaliadas, o que permite concluir que o método é robusto quando se considera a estabilidade do sistema cromatográfico, uma vez os resultados se repetiram entre várias análises realizadas no mesmo dia e em dias diferentes.

- Variações na concentração de ésteres sofridas na amostra serão identificadas pelo método. Dessa forma o método apresenta boa recuperação e sensibilidade analítica.

REFERÊNCIAS

- 1 BAPTISTA, P. et al. Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting the methyl esters content in biodiesel. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, n. 2, p. 153-159, Jan. 2008.
- 2 DEMIRBAS, A. Fuel alternatives to gasoline. **Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy**, v. 2, n. 3, p. 311-320, July 2007.
- 3 BRASIL. Ministério da Educação. Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica. **Biodiesel**. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://portal.mec.gov.br/setec/arquivos/pdf/cartilha_biodiesel.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2014.
- 4 BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. **Programa nacional de produção e uso de biodiesel**. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <http://portal.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/biodiesel/arquivos-2011/Biodiesel_Book_final_Low_Completo.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2014.
- 5 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Biodiesel**: introdução. 2012. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=60468&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1401210865627>>. Acesso em: 22 mar. 2014.
- 6 SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Biodiesel**. Disponível em: <http://www.storck.com.br/site_biodiesel/Figuras%20para%20site/Cartilha_Sebrae%20biodiesel.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2014.
- 7 KNOTHE, G. et al. **Manual do biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. 352 p.
- 8 BRAUN, S. et al. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movida a diesel: a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 472-482, nov. 2003.
- 9 MAPA das usinas de biodiesel. **Biodieselbr**, n. 38, dez./jan. 2014. Suplemento.
- 10 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução ANP nº14 de 11 de maio de 2012. Estabelece a especificação do biodiesel a ser comercializado pelos diversos agentes econômicos autorizados em todo o território nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 maio 2012. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0)>. Acesso em: 12 abr. 2014.
- 11 SOLOMONS, T. W. G. **Química orgânica**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 2 v.

- 12 SCHUCHARDT, U. et al. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 1, p. 199-210, maio 1998.
- 13 SCHWAB, A. W. et al. Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. **Fuel**, v. 66, n. 10, p. 1372-1378, Oct. 1987.
- 14 GASPARINI, F. **Avaliação e adaptação das condições da EN14103 para quantificação de ésteres em biodieseis etílicos puros de soja, babaçu, palma e sebo bovino e em suas misturas**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- 15 FREEDMAN, B. et al. Variables affecting the yield of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, n. 10, p. 1638-1643, Mar. 1984.
- 16 CANAKCI, M. et al. Biodiesel production via acid catalysis. **Transactions of the ASAE**, v. 42, n. 5, p. 1203-1210, Sept./Oct. 1999.
- 17 LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254 p.
- 18 HAWKES, S. J. Modernization of the Van Deemter equation for chromatographic zone dispersion. **Journal of Chemical Education**. v. 60, n. 5, p. 393-398, May 1983.
- 19 MUNHOZ, J. F. V. L. **Método alternativo para detecção de não conformidade em gasolina comercial brasileira do tipo c: uso da cromatografia ultrarrápida aliada a ferramentas quimiométricas**. 2013. 181 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
- 20 McNAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic gas chromatography**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2009. 239 p.
- 21 COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2006. 456 p.
- 22 FLUMIGNAN, D. L. **Caracterização da qualidade e interpretação das propriedades físico-químicas de gasolinas C brasileiras através de cromatografia gasosa e métodos quimiométricos**. 2005. 141 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- 23 CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia à gás**. São Paulo: Edgard Blücher, 1985. 266 p.
- 24 GOLAY, M. J. E. Gas chromatographic terms and definitions. **Nature**, v. 182, n. 4643, p. 1146-1147, Oct. 1958.
- 25 SEQUINEL, R. et al. Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2226-2232, out. 2010.

26 FACCHETTI, R.; CADOPPI, A. **Determination of fatty acid methyl esters by ultra fast GC**: 20-fold reduction in analysis time. Milan: Thermo Electron Corporation, 2010. 4 p. Disponível em: <www.interscience.nl/producten/topics/producten/ufm/an10058.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2014.

27 THERMO FINIGAN (Italy). P. Magni; G. Zilioli; R. Facchetti. **Chromatography column assembly with woven tubular mesh heater element**. US 7228067 B2, 29 Oct. 2001, 5 June 2007.

28 RIBANI, M. et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, jun. 2004.

29 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução no 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 27 maio 2014.

30 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. 2003. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/cgcre/doq/doq-cgcre-8_03.pdf>. Acesso em: 27 maio 2014.

31 INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validacion of analytical procedures methodology**. 1996. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Acesso em: 27 maio 2014.

32 HEYDEN, Y. V. et al. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 723-753, Mar. 2001.

33 THERMO SCIENTIFIC. **2012-2013 Chromatography columns and consumables**. Disponível em: <<http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/Catalogs%20&%20Brochures/Chromatography%20Columns%20and%20Supplies/Thermo-Scientific-Chromatography-Consumables-Catalog-GC.pdf>>. Acesso em: 18 maio 2014.

34 THERMO SCIENTIFIC. **Ultrafast CG columns**. Disponível em: <<http://www.thermoscientific.com/en/product/ultrafast-ufc-wax-gc-columns.html>>. Acesso em: 18 maio 2014.

35 BICCHI, C. et al. Direct resistively heated column gas chromatography (Ultrafast module-GC) for high-speed analysis of essential oils of differing complexities. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, n. 1/2, p. 195-207, Jan. 2004.

36 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRAS DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15674**: Biodiesel- determinação do teor total de ésteres por cromatografia gasosa. Rio de Janeiro, 2012. 1 p.

37 KNOTHE, G. Analyzing biodiesel: standards and other methods. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 83, n. 10, p. 823-833, 2006.

38 LOBO, I. P. C.; FERREIRA, S. L. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, jul. 2009.

39 BOWMAN, M.; HILLIGOSS, D.; RASMUSSEN, S. Biodiesel: a renewable and biodegradable fuel. **Hydrocarbon Processing**, v. 85, n. 2, p. 103-106, 2006.