



FURG

Dissertação de Mestrado

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL DA MISTURA MAMONA E
SOJA: DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
GLICERÍDEOS, GLICEROL LIVRE E TOTAL**

Renata Rodrigues de Moura

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2012

PRODUÇÃO DE BIODIESEL DA MISTURA MAMONA E SOJA: DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE GLICERÍDEOS, GLICEROL LIVRE E TOTAL

por

RENATA RODRIGUES DE MOURA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2012

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

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL DA MISTURA MAMONA E
SOJA: DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
GLICERÍDEOS, GLICEROL LIVRE E TOTAL**

elaborada por

RENATA RODRIGUES DE MOURA

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca (FURG - RS)

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG - RS)

Prof^a. Dr^a. Rosana de Cassia de Souza Schneider (UNISC – RS)

Rio Grande, 30 de novembro de 2012

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, meus avós Resolina e Sedney e meus pais Neuza e Renato pelo amor e carinho imensuráveis com que me criaram.

AGRADECIMENTOS

Ao **PPGQTA** e **FURG** agradeço a possibilidade de realização deste trabalho.

Ao **CNPq**, **FAPERGS** e **PETROBRAS** agradeço pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Gonçalves Montes D'Oca**, ao qual tenho imensa admiração, agradeço pela orientação, por todos os ensinamentos que foram dos mais simples aos mais complexos, pelo interesse e disponibilidade em discutir cada etapa deste trabalho, pela confiança, amizade e oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. **Ednei Gilberto Primel**, ao qual sou eternamente grata por ter me colocado pela primeira vez dentro de um laboratório de química, no primeiro semestre da graduação, despertando meu interesse pela química. Agradeço também pela co-orientação, participação na banca examinadora e pelas valiosas contribuições tanto para este trabalho quanto para minha formação profissional.

A Prof^a. Dr^a. **Rosana de Cassia de Souza Schneider**, pela participação na banca examinadora, pelas valiosas sugestões e colaborações.

A Dr^a. **Luciana Piovesan** agradeço pela amizade, boa vontade, atenção e disponibilidade em ajudar sempre.

A minha grande amiga **Adriana Neves Dias**, me faltam palavras para descrever o quanto sou grata pela sua amizade, paciência, ensinamentos passados e incontáveis discussões. Além de se fazer presente em todas as etapas deste trabalho, muitíssimo obrigada Adri!

A minha amigora **Luiza**, a “culpada” por eu estar aqui. Gracias pelas conversas regadas a chopp na Sarandí, pelo incentivo e por ter me feito acreditar.

A todos meus amigos e colegas dos laboratórios **KOLBE** e **LACOM**, agradeço a acolhida, o companheirismo, os incontáveis conhecimentos compartilhados, as discussões e os muitos momentos de descontração.

A todos meus colegas de mestrado, em especial aos meus queridos amigos **Maris**, **Ju**, **Robson** e **Tamara** agradeço por tornar nossos momentos de estudo mais descontraídos e prazerosos.

Aos meus IC's **Fran** e **Vini** muito obrigada pela amizade, disponibilidade e conhecimentos compartilhados.

Aos colegas **Rodrigo**, **Mari**, **Sergiane** e **Rui** agradeço pela amizade, auxílios prestados e conhecimentos compartilhados.

A todos meus familiares pelo imenso amor, apoio, orações, paciência pelos momentos de ausência, e até mesmo pelas críticas, sei o quanto se preocupam comigo e sou muito grata a Deus pela família maravilhosa que tenho.

A minha irmã **Pri**, que ao seu modo, sempre me incentivou das mais diversas formas que nem ela imagina, te amo mana!

Ao mano **Marcelo**, **Cacá** e **Gabe**, meu muito obrigada pela acolhida, vocês foram fundamentais na minha adaptação à Rio Grande, me apoiaram, incentivaram e principalmente estão sempre presentes, amo!

A minha amiga e colega **Liziara**, agradeço por ter me acolhido e levado para dentro de sua casa compartilhando comigo sua família, por estar sempre presente e pelos incontáveis momentos de descontração.

A minha família riograndina, **Irá**, **Homero**, **Lizi**, **Paulinha**, **Cae** e **Diego**, agradeço o carinho, o apoio, a companhia, a torcida, as orações e os muitos momentos de descontração.

Aos meus amores, **Diego** e **Caetano**, agradeço por preencherem meu coração, aos muitos momentos felizes que me proporcionam, e principalmente ao **Diego** pelo companheirismo, paciência e carinho incondicionais.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ANEXOS	xvii
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxii
1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 Geral	27
2.2 Específicos	27
3. REFERENCIAL TEÓRICO	28
3.1. Produção de Biodiesel	28
3.1.1. Produção de Biodiesel de Mamona	32
3.2. Parâmetros de Qualidade do Biodiesel: determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos	34
3.2.1. Métodos de referência para a determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos	35
3.2.2. Reação de derivatização para a determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel	39
3.2.3. Outros métodos para determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos	41
3.3. Cromatografia Gasosa	44
3.4. Parâmetros analíticos da validação	45

4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1. Equipamentos.....	47
4.2. Materiais e vidrarias.....	47
4.3. Sistema de Titulação Potenciométrica.....	47
4.4. Sistema Cromatográfico	48
4.5. Reagentes e solventes	48
4.5.1. Reagentes e solventes para síntese	48
4.5.2. Reagentes e solventes analíticos.....	49
4.5.2.1. Padrões analíticos	49
4.5.2.2. Solventes analíticos.....	49
4.6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	50
4.6.1. Cálculos da massa molecular do óleo de soja (Regra de Kay)	50
4.6.2. Síntese de Biodiesel.....	51
4.6.3. Análise por cromatografia em camada delgada	52
4.6.4. Determinação do índice de acidez	52
4.6.5. Preparo das soluções padrões.....	53
4.6.5.1. Preparo da curva analítica.....	55
4.6.6. Preparo de amostra.....	56
4.6.6.1. Preparo de amostra para determinação do teor de GL e GT e glicerídeos	56
4.6.6.2. Preparo de amostra para determinação do teor de ésteres	56
4.6.6.3. Preparo de amostra para determinação do perfil de ácido graxo	56
4.6.7. Otimização da reação de derivatização utilizando MSTFA para o biodiesel metílico da mistura mamona e soja.....	56
4.6.8. Análises por Cromatografia em Fase Gasosa.....	58
4.6.8.1. Condições cromatográficas para determinação do teor de glicerol livre e total, mono, di, e triglicerídeos	58
4.6.8.2. Condições cromatográficas para determinação do teor de ésteres e perfil graxo	58

4.6.9. Identificação e quantificação de mono-, di- e triglicerídeos.....	59
4.6.10. Cálculos utilizados para quantificação.....	60
4.6.10.1. Cálculo para quantificação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel	60
4.6.10.2. Determinação do teor de ésteres e perfil graxo	61
4.6.12. Validação do método.....	61
4.6.12.1. Curva analítica e linearidade	62
4.6.12.2. Exatidão.....	63
4.6.12.3. Precisão.....	65
4.6.12.4. Robustez	66
4.6.12.5. Avaliação do efeito matriz.....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	68
5.1. Síntese do biodiesel.....	70
5.1.1. Variação das condições do método de produção de biodiesel	75
5.2. Determinação do teor de ésteres.....	83
5.3. Determinação do perfil graxo do biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70).....	83
5.4. Otimização da reação de derivatização com MSTFA para biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70)	84
5.5. Identificação e quantificação de mono-, di- e triglicerídeos	94
5.6. Validação do método	98
5.6.1. Curva analítica e linearidade.....	98
5.6.2. Exatidão	99
5.6.3. Precisão	99
5.6.4. Robustez	102
5.6.5. Efeito Matriz	102
5.6.6. Aplicação do método para determinação simultânea de GL, GT e glicerídeos em biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70)	107
6. CONCLUSÃO	112

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	113
8. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	114
9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO	115
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
11. ANEXO	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de transesterificação (R representa uma mistura de várias cadeias graxas. R' representa a cadeia alquílica do álcool empregado para produção de biodiesel)	29
Figura 2. Ricinoleato de Metila ou Etila (principal constituinte do biodiesel de mamona).....	30
Figura 3. Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (perfil nacional) ²⁷	31
Figura 4. Representação da reação de silição para análise de glicerol e glicerídeos.....	41
Figura 5. Modelo de curva utilizado no método de adição padrão	64
Figura 6. Fluxograma do processo desenvolvido em nosso laboratório para a síntese de biodiesel de mamona.....	69
Figura 7. Síntese desenvolvida no LKSO para produção de Biodiesel etílico e metílico utilizando a adição 'on pot' de ácido sulfúrico	70
Figura 8. Conversão do sabão em ácido graxo (a); reação de neutralização do catalisador (b).....	72
Figura 9. Placas cromatográficas das reações de transesterificação alcalina com metanol, T=60 °C e 1% de NaOH. Comparando 1 h e 1,5 h de reação. S: éster metílico de soja; M: éster metílico de mamona; e M:S: éster metílico da mistura mamona e soja	79
Figura 10. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos da mistura de óleos de mamona e soja (30:70).....	84
Figura 11. Representação da reação de silição	86

Figura 12. Comparação entre diferentes volumes de MSTFA na reação de derivatização (n= 9).....	88
Figura 13. Em preto, pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol do biodiesel de soja (amostra de referência) e em azul o pico (S)-(-)-1,2,4-butanotriol do biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) derivatizado com 100 µL de MSTFA.....	89
Figura 14. Em preto, pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol do biodiesel de soja (amostra de referência) e em azul o pico (S)-(-)-1,2,4-butanotriol do biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) derivatizado com 160 µL de MSTFA.....	89
Figura 15. Perfil cromatográfico do biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) derivatizado com 100 µL de MSTFA.....	90
Figura 16. Perfil cromatográfico do biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) derivatizado com 160 µL de MSTFA.....	91
Figura 17. Perfil cromatográfico do 3° nível de concentração da monooleína (em preto) e da mistura dos padrões dos monoglicerídeos (em azul), sob as condições de análise do método ASTM D 6584.....	94
Figura 18. Perfil cromatográfico do 3° nível de concentração da monooleína (em preto) e da mistura dos padrões dos monoglicerídeos no 2° nível de concentração (em azul), das amostras de biodiesel metílico de soja (em verde), de mamona (em rosa) e da mistura mamona e soja (30:70) (em marrom) sob as condições de análise do método ASTM D 6584.....	95
Figura 19. Perfil cromatográfico do 3° nível de concentração da dioleína (em preto) e da mistura dos padrões dos diglicerídeos no 2° nível de concentração (em azul), das amostras de biodiesel metílico de soja (em verde), de mamona (em rosa) e da mistura mamona e soja (30:70) (em marrom) sob as condições de análise do método ASTM D 6584.....	96
Figura 20. Perfil cromatográfico do 5° nível de concentração da trioleína (em preto), biodiesel metílico de mamona (em azul) e da mistura mamona e soja (30:70) (em rosa) sob as condições de análise do método ASTM D 6584	97

Figura 21. Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da mistura dos padrões analíticos sob as condições de análise do método ASTM D 6584	99
Figura 22. Curvas analíticas do glicerol no solvente e na matriz (biodiesel) ..	103
Figura 23. Curvas analíticas da monooleína no solvente e na matriz (biodiesel)	103
Figura 24. Curvas analíticas da dioleína no solvente e na matriz (biodiesel) .	104
Figura 25. Curvas analíticas da trioleína no solvente e na matriz (biodiesel) .	104
Figura 26. Efeito matriz (%) para os compostos calculados a partir das inclinações das curvas analíticas no solvente e na matriz (biodiesel).....	105
Figura 27. Perfil cromatográfico de uma amostra de biodiesel metílico de soja analisada.....	110
Figura 28. Perfil cromatográfico de uma amostra de biodiesel metílico de mamona analisada	110
Figura 29. Perfil cromatográfico de uma amostra de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) analisada	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de FAME em óleo de mamona ²⁶	31
Tabela 2. Resultado obtido para a identificação do rendimento mais elevado a partir de catalisadores alcalinos. Condições reacionais: temperatura: 65 ° C, a concentração de catalisador: 0,35% (m/m) de óleo, o tempo reacional: 2 h, rpm: 250.	32
Tabela 3. Concentrações (%m/m) para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos	33
Tabela 4. Métodos de referência para análise de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel de acordo com os padrões ANP 14/2012, ASTM D 6751 e EN 14214	37
Tabela 5. Teor máximo permitido para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel de acordo com as normas ANP 14/2012, ASTM D 6751 e EN 14214	39
Tabela 6. Dados para obtenção da massa molecular do óleo de soja	50
Tabela 7. Concentrações das soluções estoque em piridina	53
Tabela 8. Concentrações das soluções estoque em hexano.	54
Tabela 9. Volumes, em µL, das soluções estoque para preparo das curvas analíticas de cada composto	55
Tabela 10. Níveis de concentração segundo ASTM D 6584 para os compostos em % (m/m) ⁵⁷	62
Tabela 11. Condições reacionais, rendimentos e acidez após transesterificação alcalina, utilizando razão molar de álcool:óleo de 6:1 e 1% de NaOH, seguida da adição de H ₂ SO ₄ (Etapa 1)	71

Tabela 12. Condições reacionais, índice de acidez e percentual de conversão de AGL após a esterificação (Etapa II), utilizando metanol:AG (mol:mol) 60:1 e 10% (m/m) de H ₂ SO ₄	73
Tabela 13. Condições reacionais, rendimentos e acidez após transesterificação alcalina e adição de H ₂ SO ₄ (etapa 1), utilizando metanol:TG(mol:mol) 6:1, para as reações com mistura de óleos mamona:soja (30:70)	74
Tabela 14. Condições reacionais, índice de acidez e percentual de conversão de AGL após a esterificação às reações com mistura (Etapa 2), utilizando metanol:AG (mol:mol) 60:1 e 10% (m/m) de H ₂ SO ₄	74
Tabela 15. Condições reacionais, rendimentos e acidez após transesterificação alcalina e adição de H ₂ SO ₄ (Etapa 1), utilizando metanol:TG(mol:mol) 6:1	76
Tabela 16. Condições reacionais, índice de acidez e percentual de conversão de AGL após a esterificação(Etapa 2), utilizando metanol:AG (mol:mol) 60:1 e 10% (m/m) de H ₂ SO ₄	77
Tabela 17. Condições reacionais, rendimentos e acidez após 1,5 horas de transesterificação alcalina e adição de H ₂ SO ₄ (Etapa 1) usando metanol:TG (mol:mol) 6:1 e 1% (m/m) de NaOH como catalisador.	80
Tabela 18. Rendimento médio, teórico e obtido, e desvio padrão do rendimento médio obtido para o biodiesel metílico de soja, mamona e da mistura mamona e soja (30:70)	81
Tabela 19. Condições reacionais, índice de acidez e percentual de conversão de AGL após a esterificação (1,5h de transesterificação) (Etapa 2) usando metanol:AG (mol:mol) 60:1, e 10% (m/m) de H ₂ SO ₄ como catalisador	82
Tabela 20. Composição de ácidos graxos da mistura mamona e soja (30:70)	83
Tabela 21. Relação entre as áreas do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol e razão das áreas do GL, mono- e diricinoleína nas figuras 14 e 15.	92

Tabela 22. Volume de MSTFA consumido pelos contaminantes presentes no biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70)	93
Tabela 23. Volume de MSTFA consumido pelos contaminantes presentes no biodiesel metílico de soja	93
Tabela 24. Resultados de linearidade e curva analítica de cada composto no método considerando os padrões internos	98
Tabela 25. Exatidão (%) e RSD (%) do método para os compostos no biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) em diferentes níveis.....	100
Tabela 26. Recuperação (%) e RSD (%) do método para a trioleína no biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) em diferentes níveis.....	101
Tabela 27. Precisão instrumental (RSDi) para os compostos nos níveis de concentração da curva analítica em % (m/m)	102
Tabela 28. Concentrações (%m/m) para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos das reações com 1 h de transesterificação	107
Tabela 29. Concentrações (%m/m) para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos com 1,5 h de transesterificação	109

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Cálculos estequiométricos do volume de MSTFA consumido para derivatizar 100 µL do padrão interno (S)-(-)-1,2,4-butanotriol e 0,1 g de biodiesel da mistura mamona e soja (30:70); cálculo do volume de MSTFA consumidos pelos contaminantes do biodiesel de mistura; e ainda, calculo do consumo de MSTFA para sililar os contaminantes do biodiesel metílico de soja (referência).....	123
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. ABNT– Associação Brasileira de Normas Técnicas
2. AGL – Ácido Graxo livre
3. ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
4. APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
5. ASTM – American Society for Testing and Materials
6. B10 – Mistura óleo diesel/biodiesel, combustível composto de (100-10)% em volume de óleo diesel e 10% em volume do biodiesel
7. B100 – Combustível composto de 100 % em volume de biodiesel
8. BSTFA - *N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida*
9. DD - Detecção por densidade, do inglês *Density Detection*
10. ELSD - Detecção por dispersão de luz por evaporação, do inglês *Evaporative Light Scattering Detector*
11. EN – European Standard
12. ESI - Ionização por Eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*
13. FAAEs – Ésteres Alquílicos de Ácidos Graxos, do inglês *Fatty Acid Alkyl Esters*
14. FAMEs – Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos, do inglês *Fatty Acid Methyl Esters*
15. FID – Detecção por Ionização em Chama, do inglês *Flame Ionization Detection*
16. GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
17. GL – Glicerol Livre
18. GT – Glicerol Total

19. HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
20. IA – Índice de Acidez
21. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
22. MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*
23. MSTFA – *N*-Metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoracetamida
24. NBR - Denominação de norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas
25. OCI/PTV - do inglês *On Column Injector/ Programmed Temperature Volatilisation*
26. PDA - Detecção por Arranjo de Fotodiodos, do inglês *Photodiode Array Detector*
27. r^2 - Coeficiente de Determinação
28. R – Recuperação
29. rpm – rotações por minuto
30. RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
31. s – estimativa do desvio padrão absoluto
32. SEC - Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC do inglês *size-exclusion chromatography*)
33. TG – Triacilglicerol (Triglicerídeo)
34. TLC - Cromatografia de camada fina, do inglês *Thin Layer Chromatography*
35. t_R – tempo de retenção

36. v/v – volume por volume
37. UV - Detecção no Ultravioleta, do inglês *Ultraviolet Detector*

RESUMO

Título: Produção de biodiesel da mistura mamona e soja: otimização de método para determinação simultânea de glicerídeos, glicerol livre e total

Autor: Renata Rodrigues de Moura

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca

A produção de biodiesel utilizando óleo de mamona ainda é um grande desafio para comunidade científica. Vários parâmetros são exigidos pelas normas que regulamentam a qualidade do biodiesel e no caso do uso de óleo de mamona a adequação do biodiesel a estes parâmetros nem sempre é possível. Neste trabalho utilizou-se um processo em duas etapas, transesterificação-esterificação, para produção de biodiesel metílico da mistura mamona e soja nas proporções 30% e 70%, respectivamente. O uso desta metodologia levou a produção de biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) dentro das especificações da ANP, utilizando 1% de NaOH como catalisador alcalino e tempo de 1,5 h para a reação de transesterificação (Etapa 1). Após esta etapa, foi realizada a adição 'on pot' de H₂SO₄ com objetivo de quebrar o sabão formado e neutralizar o catalisador. Na etapa II foi realizada a esterificação, empregando 10 % de H₂SO₄ e tempo de 1 h, para diminuir o índice de acidez final do biodiesel. Com estas duas etapas foi possível converter todo o óleo em biodiesel diminuindo os intermediários no meio reacional. Para o biodiesel produzido foi otimizado e validado método para a determinação simultânea de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos empregando Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (GC-FID), e reação de derivatização com *N*-metil-*N*-(trimetilsilil) trifluoracetamida (MSTFA) como preparo de amostra. Os parâmetros de validação considerados foram: curva analítica, linearidade, exatidão, precisão, robustez e efeito matriz. Foram estabelecidas as condições cromatográficas do método ASTM D 6584. O método validado apresentou boa linearidade com todas as curvas analíticas com r^2 maiores que 0,997. A quantidade de MSTFA foi otimizada para o biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70), um volume de 160 μ L de MSTFA foi escolhido como ideal. Os valores de exatidão ficaram entre 70 e 141% com valores de precisão menores que 10%. O método foi robusto frente às variações da composição química da matriz. Apenas a dioleína apresentou efeito matriz significativo. De acordo com os resultados, o método apresentado mostrou-se adequado para a produção de biodiesel e para determinação de glicerídeos, glicerol livre e total em amostras de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70).

Palavras-chaves: biodiesel de misturas, mamona, soja, controle de qualidade.

ABSTRACT

Title: Production of biodiesel from castor oil and soybean blend: optimization method for simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol

Author: Renata Rodrigues de Moura

Advisor: Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca

Biodiesel production from castor oil is a great challenge for the scientific community. Several parameters are demanded by the standards regulating the quality of the biodiesel and in the case of castor oil the adequacy of biodiesel to these parameters not always possible. In this study a double-step process, transesterification-esterification reaction, was used to produce fatty acid methyl esters from castor oil and soybean blends, 30% and 70%, respectively. The use of this methodology led to the production of biodiesel from castor and soybean (30:70) blend within the specifications of ANP. The transesterification reaction (Step 1) was carried using 1% of catalyst (NaOH) for 1.5 h. After this step, the on pot addition of H₂SO₄ was done with the objective of break the soap formed and neutralized the catalyst. Afterward, to reduce the acid value of the biodiesel the esterification (Step II) was carried out using 10% of H₂SO₄ for 1 h. The double step process converts the oil into biodiesel reducing intermediates in the reaction. In addition, the method for the simultaneous determination of free and total glycerol, mono-, di- and triglycerides using Gas Chromatography with Flame Ionization Detection (GC-FD) and derivatization reaction as sample preparation using *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) was optimized and validated. In this case, the validation parameters were considered: analytical curve, linearity, accuracy, precision, robustness and matrix effect. Chromatographic conditions were set down according to the method ASTM D 6584. The validated method showed good linearity with all analytical curves with r^2 greater than 0.997. The derivatization reaction with MSTFA was optimized due to the chemical composition of the methyl biodiesel from castor and soybean oil (30:70) blend, a volume of 160 μ L of MSTFA has been chosen as optimum. Its accuracy values were between 70 and 141% with RSD <10%. The method was robust even when there were variations in the matrix. Only the diolein showed significant matrix effect. According to the results, the presented method proved to be adequate for the production of biodiesel and for determination of glycerides, free glycerol and total samples of methyl biodiesel from castor oil and soybean (30:70) blend.

Keywords: biodiesel blends, castor oil, soybean oil, quality control.

1. INTRODUÇÃO

Devido ao fato de a maior parte da energia consumida no mundo prover de fontes não renováveis de energia como petróleo, carvão mineral e gás natural, a busca por fontes renováveis de energia, como por exemplo, o biodiesel, é muito importante no sentido da redução do consumo de combustíveis fósseis e também na redução da poluição ambiental.¹

Deve ser levado em conta que o petrodiesel é essencial para países como o Brasil que se utiliza do transporte viário para escoar grande parte de sua produção agrícola e industrial, além do transporte de pessoas. Por substituir parcial ou totalmente o diesel, o biodiesel é um grande vetor de redução das emissões de diversos poluentes (monóxido de carbono, enxofre, etc) e no combate ao efeito estufa, sendo miscível, físico e quimicamente semelhante ao óleo diesel, podendo ser utilizado puro ou misturado ao diesel em diversas proporções, permitindo o uso do biodiesel em motores do ciclo diesel sem a necessidade de adaptações significativas.^{2, 3}

A produção de biodiesel constitui-se também numa alternativa de suma importância para o desenvolvimento regional e inclusão social, um dos principais objetivos do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel-PNPB.³ O estado do Rio Grande do Sul apresenta grande potencial para produção de diferentes oleaginosas. Estudos realizados pela Embrapa-CPACT demonstraram que a Metade Sul do RS possui clima e solo extremamente favoráveis ao cultivo da mamona, permitindo uma alta produtividade de grãos por safra e com elevado teor de óleo. Assim, essa oleaginosa apresenta uma possibilidade concreta de desenvolvimento regional, através da produção de biodiesel.⁴

Dentro deste contexto na FURG busca-se desenvolver processos adequados para produção de biodiesel a partir de óleos vegetais como, por exemplo, soja, mamona e outras oleaginosas não convencionais, como, microalgas.⁵ Cabe salientar que, pesquisas envolvendo a produção de biodiesel de óleo de mamona não têm sido realizadas por instituições do

Estado e os processos desenvolvidos ou adquiridos pelas empresas produtoras de biodiesel não estão adequados para esta oleaginosa. Apesar de a mamona ter tecnologia de produção bem desenvolvida, os óleos e gorduras, como óleo de soja, canola, palma, coco, girassol e sebo bovino são as principais fontes de biodiesel.⁶

O óleo de mamona é obtido de uma euforbiácea, *Ricinus communis L.* (mamoneira, palma christi, mamona, rícino), uma planta nativa da Ásia, o qual tem sido objeto de crescente interesse no Brasil por tratar-se de uma fonte comercial de óleo vegetal não comestível, cujas sementes contêm em média de 40 a 55% de óleo, sendo uma fonte de matéria-prima promissora para a produção de biodiesel.^{6,7}

A produção de biodiesel a partir de óleo de mamona ainda é um grande desafio para comunidade científica, mas não podemos esquecer que o biodiesel de mamona possui características peculiares que devem ser consideradas. Qualquer biodiesel melhora a lubricidade do diesel, mas aquele produzido a partir do óleo de mamona possui capacidade superior aos demais, devido à presença de três átomos de oxigênio em sua composição.^{8,9}

Devido à melhora da lubricidade do diesel a utilização do biodiesel de mamona dispensaria o uso de outros aditivos utilizados no diesel após o processo de dessulfuração, processo extremamente caro e complexo. Entretanto, para o biodiesel de mamona atender as normas da ANP é necessário que ele seja misturado a outro óleo, ex.: soja, compondo até 30% da mistura transesterificada. Estudos mostram ainda que o biodiesel de mamona qualifica o biodiesel de soja para a exportação quando o biodiesel for obtido com 30% de óleo de mamona e 70% de óleo de soja. Agregando qualidade ao biodiesel de soja devido à redução em seu nível de insaturação e da sensibilidade à oxidação, critérios importantes para a adequação deste às normas europeias.^{8, 9,10}

Considerando todas as vantagens do uso do óleo de mamona para produção de biodiesel e a escassez de trabalhos científicos referentes à produção de biodiesel de mistura de óleo de mamona com oleaginosas convencionais, buscou-se adaptar o processo de produção de biodiesel

desenvolvido por D'Oca e colaboradores⁷ à mistura dos óleos mamona e soja na proporção 30:70% (m/m) visando à produção de biodiesel dessa mistura com a finalidade de comprovar a eficiência do método de produção e validar método de controle de qualidade para adequar a produção de biodiesel de mistura mamona e soja 30:70 as normas de certificação.

Vários parâmetros são exigidos pelas normas que regulamentam a qualidade do biodiesel. A determinação dos teores de glicerol livre e total, mono-, di-, e triglicerídeos após o processo de produção estão entre os principais indicadores da qualidade do biodiesel. Os glicerídeos podem aumentar a viscosidade do biodiesel, reduzindo a combustão, provocando entupimento do filtro de combustível e depósitos em pistões, válvulas e bicos injetores do motor. Além de indicar a eficiência do processo de transesterificação na conversão de óleos e gorduras em ésteres. Elevadas concentrações de glicerol livre podem causar a separação do glicerol nos tanques de estocagem da mistura diesel:biodiesel, a queima dessa mistura pode emitir aldeídos, produzir depósitos e entupir bicos injetores do motor. A determinação do teor de glicerol livre indica ainda a eficiência da etapa de purificação do processo e separação das fases glicerol:biodiesel.^{11,12}

Ao considerar o biodiesel metílico de mamona, e misturas de mamona com oleaginosas convencionais, para a avaliação desses contaminantes é necessária a utilização de três métodos: ABNT NBR: 15341, 15342 e 15344, sendo o último um método clássico. Já quando se trata de biodiesel metílico de óleo de soja ou ésteres metílicos de composição semelhante a esse se empregam os métodos de referência ASTM D 6584 e EN 14105.¹³ Portanto, este trabalho utilizou os métodos ASTM D 6584 e EN 14105 para o biodiesel metílico de mistura mamona e soja (30:70), uma vez que possibilita a determinação simultânea dos teores de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos. Para tal foi necessária à otimização da reação de silição utilizada por esses métodos, devido à presença das hidroxilas derivadas do óleo de mamona. Visto que, o único estudo relatado na literatura com relação à otimização dessa reação foi feito com biodiesel etílico de mamona e não com mistura deste com outros biodiesel.¹⁴ Portanto, é de suma importância estudos

que busquem atender a necessidade de desenvolver e adequar métodos de produção e análise de biodiesel à grande variedade de matérias-primas disponíveis no Brasil visando a qualidade do biodiesel nacional. Entretanto, a determinação dos teores de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos ainda é um desafio principalmente no caso da produção de biodiesel de mamona o que deve ser também aplicado para o caso de misturas de mamona e outras oleaginosas.

Todos estes aspectos devem ser considerados para estimular a produção de biodiesel de misturas de oleaginosas no Estado do Rio Grande do Sul e no País colocando este biocombustível a serviço da inclusão social o que justifica o desenvolvimento de projetos e atividades de pesquisa inovadoras que busquem soluções para problemas das diferentes regiões do país.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Produzir biodiesel metílico a partir das oleaginosas soja, mamona e da mistura mamona:soja, validar um método para controle da qualidade do biodiesel visando adequá-lo as especificações exigidas pela ANP.

2.2 Específicos

- Produzir biodiesel metílico de mamona, de soja e da mistura mamona e soja nas proporções 30% mamona e 70% soja, utilizando catalisadores alcalinos visando à diminuição dos intermediários oriundos do processo de produção;
- Adaptar o processo de produção de biodiesel desenvolvido para a produção de FAEEs derivados de óleos vegetais hidroxilados à mistura das oleaginosas mamona e soja, na proporção 30:70% (m/m)
- Otimizar a reação de derivatização empregada pelo método de determinação simultânea dos teores de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos ao biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) empregando Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (GC-FID).
- Validar o método para determinação simultânea dos teores de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos do biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70).
- Aplicar o método validado para biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Produção de Biodiesel

O interesse por biodiesel continua a aumentar em todo o mundo. Isto é motivado principalmente pelas preocupações em relação a emissão de gases de efeito estufa (GEE) e as mudanças climáticas globais, o interesse por fontes de energia renováveis / sustentável, e o interesse no desenvolvimento de fontes de combustíveis doméstico e mais seguros. Nos últimos anos, vários países embarcaram em vias legislativas e / ou regulamentares que incentivam o aumento do uso de biodiesel - usando tanto incentivos e requisitos volumétricos prescritivos, como por exemplo, o uso de B10, ou seja, misturas de 10% de biodiesel ao diesel mineral.¹⁵

Vários fatores contribuem para o custo do biodiesel dentre eles a matéria-prima, insumos, a natureza de purificação, o seu armazenamento, etc. No entanto, o fator principal que determina o alto custo de produção de biodiesel é a matéria-prima, o que é cerca de 80% do custo total de funcionamento. A produção de biodiesel está passando por rápidas reformas tecnológicas nas indústrias e universidades. Atualmente, a principal desvantagem para produção e comercialização de biodiesel é o seu custo mais elevado em comparação ao diesel de petróleo. Inúmeros métodos estão disponíveis e têm sido adaptados para a redução da viscosidade dos óleos vegetais. Quatro processos principais são empregados para produção de biodiesel: o uso de misturas binárias com diesel mineral, micro-emulsões, craqueamento térmico (pirólise) e transesterificação. Um dos métodos mais comuns utilizados para reduzir a viscosidade do óleo na indústria é a transesterificação, que ocorrem entre um óleo ou gordura e um álcool (metanol, etanol, butanol), na presença de um catalisador (homogêneo ou heterogêneo) ou sem a aplicação de catalisadores.^{16,17,18,19}

Quimicamente, o biodiesel consiste em ésteres alquílicos de ácidos graxos (FAAEs) de cadeia longa oriundos da esterificação de ácidos graxos livres (AGL) ou transesterificação de triglicerídeos (TG). O biodiesel pode ser produzido a partir de uma grande variedade de óleos e gorduras sendo a reação de transesterificação a mais comumente aplicada (Figura1).^{1,20,22}

A transesterificação tem o objetivo de reduzir a viscosidade de óleos e gorduras visando seu uso em motores de combustão interna, evitando assim a formação de incrustações, depósito e problemas operacionais. Métodos como o uso de misturas binárias com diesel mineral, pirólise, microemulsificação (ou mistura co-solvente) também tem sido estudados para este fim. No entanto, apenas a transesterificação leva a produtos denominados biodiesel.^{21,22}

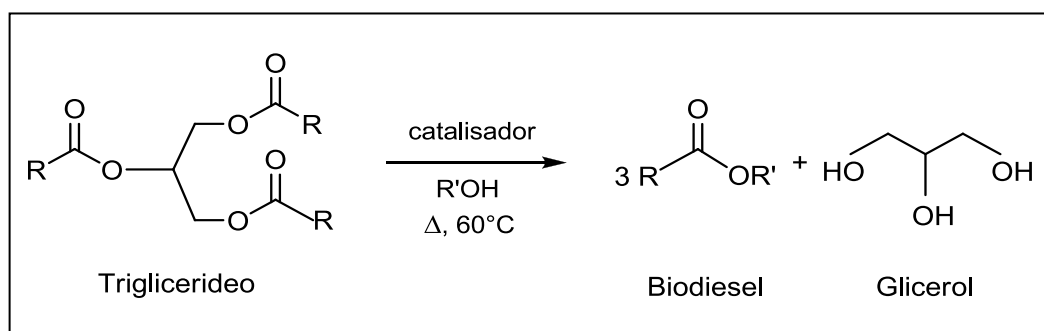


Figura 1. Reação de transesterificação (R representa uma mistura de várias cadeias graxas. R' representa a cadeia alquílica do álcool empregado para produção de biodiesel)

Na transesterificação, óleos e gorduras reagem com um álcool de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, na presença de um catalisador para produzir os ésteres alquílicos correspondentes da mistura de ácidos graxos (AG) oriunda do óleo ou gordura utilizado. Nesta reação, di- e monoglicerídeos são formados como intermediários.¹² Primeiro ocorre a conversão de triglicerídeos à diglicerídeos, que é seguido da conversão de diglicerídeos à monoglicerídeos e monoglicerídeos à glicerol, produzindo uma molécula de éster metílico ou etílico de cada glicerídeo.¹⁵

Existe uma preferência por catalisadores alcalinos como o hidróxido de sódio (NaOH) e o hidróxido de potássio (KOH), por serem mais eficientes e

menos corrosivos do que os catalisadores ácidos, tornando-se preferido para o uso industrial.²³ Porém, para matérias primas com alto índice de acidez são indicados catalisadores ácidos. O mais usado é o ácido sulfúrico, H_2SO_4 , ocorrendo simultaneamente a transesterificação ácida dos TG e esterificação dos AGL.²²

O biodiesel é formado por uma mistura de ésteres derivados de diferentes tipos de ácidos graxos com sua constituição química variada em relação ao comprimento das cadeias hidrocarbônicas, ao grau de insaturação ou à presença de outras funções químicas. A escolha da matéria-prima para a produção de biodiesel depende largamente de fatores geográficos. Dependendo da origem e da qualidade da matéria-prima, mudanças no processo de produção podem ser necessárias.²²

É possível, também, usar mais de um tipo de óleo ou gordura no mesmo biodiesel. A mamona, por exemplo, se usada em mistura com outros óleos, agrega propriedades positivas ao produto final, como a redução do ponto de congelamento, sem alterar as especificações exigidas pela ANP.²⁴ No caso do biodiesel de mamona, este é constituído por aproximadamente 90% do éster ricinoléico, derivado de um ácido graxo monoinsaturado que contém um grupo hidroxílico ligado ao carbono 12 (Figura 2). Os 10% restantes são ésteres de ácidos graxos não hidroxilados, principalmente linoléico e oléico, Tabela 1.^{25,26}

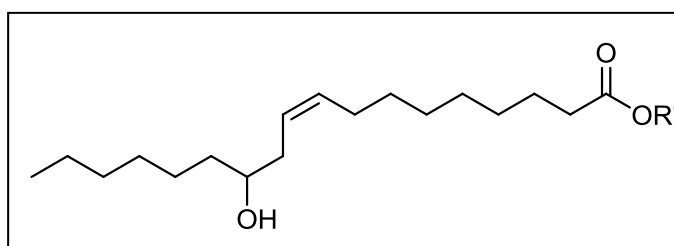
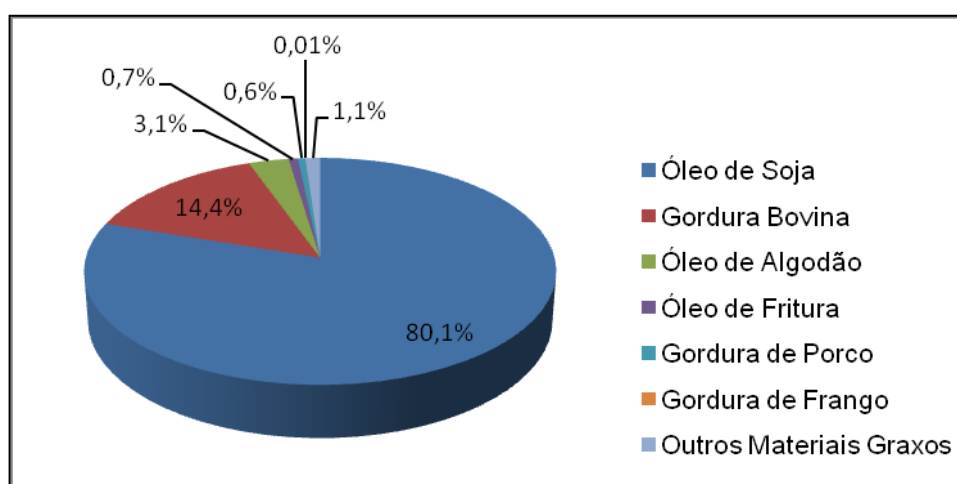


Figura 2. Ricinoleato de Metila ou Etila (principal constituinte do biodiesel de mamona).

Tabela 1. Distribuição de FAME em óleo de mamona ²⁶

Ácido Graxo	Composição (%)
Ácido palmítico	1,4 ±0,2
Ácido linoléico	4,9 ±0,2
Ácido Linolênico	0,3 ±0,1
Ácido Oléico	3,5 ±0,2
Ácido Oléico (isômero)	0,3 ±0,1
Ácido Esteárico	0,9 ±0,2
Ácido Ricinoléico	88,2 ±1,4

No Brasil, atualmente existem 64 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 19.533,95 m³/dia. Destas 64 plantas, 61 possuem Autorização para Comercialização do biodiesel produzido, correspondendo a 18.606,25 m³/dia de capacidade autorizada para comercialização. As matérias primas utilizadas no País para a produção de biodiesel estão apresentadas na Figura 3. ²⁷

**Figura 3.** Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (perfil nacional) ²⁷

3.1.1. Produção de Biodiesel de Mamona

O óleo de mamona possui emprego consolidado pela indústria química e farmacêutica. Em vários países do hemisfério Sul a utilização deste como biocombustível também vem sendo estudada em conexão com os aspectos sociais e ecológicos.⁶

Ramezani e colaboradores²⁸ investigaram os parâmetros que afetam a reação de transesterificação do óleo de mamona. Inicialmente foram realizados quatro experimentos testando diferentes catalisadores: metóxido de Sódio (NaOCH_3), hidróxido de sódio (NaOH), metóxido de potássio (KOCH_3) e hidróxido de potássio (KOH) sob as mesmas condições reacionais. O melhor rendimento foi obtido utilizando metanol como solvente e KOCH_3 como catalisador. Como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Resultado obtido para a identificação do rendimento mais elevado a partir de catalisadores alcalinos. Condições reacionais: temperatura: 65 ° C, a concentração de catalisador: 0,35% (m/m) de óleo, o tempo reacional: 2 h, rpm: 250.

Reação	Catalisador	Rendimento (%)
1	NaOCH_3	67,1
2	NaOH	75
3	KOCH_3	76,2
4	KOH	58,7

A partir desse resultado foi aplicado um delineamento experimental de Taguchi considerando as seguintes variáveis: temperatura de reação, intensidade de mistura, a razão de álcool/óleo e catalisador. As condições ótimas de temperatura de reação e intensidade de mistura foram 65 °C e 400 rpm, respectivamente. Foi perceptível que o aumento de temperatura e agitação reduziu o rendimento. No entanto, a otimização dos outros dois parâmetros não pode ser alcançada.²⁸

Canoira e colaboradores²⁹ sintetizaram por metanólise catalisada por metóxido de sódio ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) de óleo de mamona. Varias condições foram testadas em dois reatores de diferentes volumes (1,5 e 50 L) visando produzir FAMES que pudessem ser misturados com o diesel fóssil para a sua utilização como combustível em motores de combustão interna. Para ambos volumes as condições ideais foram: razão molar metanol: TG de 5:1 a 1% de catalisador em relação a massa de TG, por 90 min a 40 °C. Segundo os autores, as misturas de FAME de mamona e diesel até aproximadamente 40% volume de FAME de mamona atende a maioria das especificações. Dentre os parâmetros de qualidade determinados estavam o glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos obtendo uma ampla faixa de variação nos resultados da concentração de cada contaminante, como observado na Tabela 3.

Tabela 3. Concentrações (%m/m) para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos

Amostra	Glicerol livre	mono-	di-	tri-	Glicerol tota
EN 14214	0,020	0,80	0,20	0,20	0,25
Reator 1,5 L	<0,005	0,90	0,52	0,85	---
Reator 50 L	1,23	0,45	0,09	0,08	1,36

É relatado que a concentração de mono-, di- e triglicerídeos encontrou-se dentro das especificações estabelecidas pela norma europeia indicando boa conversão do óleo de mamona em biodiesel na reação realizada no reator de 50 L.²⁹

Berman e colaboradores³⁰ estudaram as variáveis: viscosidade cinemática, ponto de nuvem, estabilidade oxidativa, número de cetano, lubricidade e teor de água e sedimentos; referentes à ésteres metílicos de

ácidos graxos derivados do óleo de mamona puro (B100) e sua mistura com diesel mineral. A viscosidade cinemática e temperatura de destilação do B100 foram as duas únicas propriedades que não atenderam as especificações. Em contraste, B10 cumpriu todas as especificações.

D'Oca e colaboradores⁷ desenvolveram um processo constituído em duas etapas para produção de biodiesel de mamona via rota etílica. Na etapa I, é realizada a transesterificação alcalina por 1 h a 60 °C, seguida da adição *'on pot'* de H₂SO₄ concentrado, por 0,5 h a 60 °C, com objetivo de quebrar o sabão formado convertendo-o em AGL e remover o catalisador. Na etapa II foi realizada a esterificação dos AGL, diminuindo assim o índice de acidez do meio. Dentre as razões molares para etanol:óleo e percentual de catalisador em relação a massa de óleo investigadas na etapa I, as condições ideais foram: 6:1 etanol: óleo e 1% de NaOH. Para a etapa II as condições reacionais ótimas foram 60:1 etanol:AGL e 10% de H₂SO₄. Este trabalho trouxe como inovação científica a adição *'on pot'* de H₂SO₄ concentrado, um passo chave para o sucesso na separação de fases FAEEs/glicerol devido à quebra *in situ* de sabão produzido na reação de transesterificação. Segundo os autores, este processo de duas etapas apresenta vantagens importantes quando comparado com o processo convencional de transesterificação alcalina, dentre elas a economia e a redução de efluentes.

Barbosa e colaboradores³¹ estudaram a transesterificação alcalina da mistura de óleo de mamona e de soja em proporções 15/85, 25/75, 50/50, e 75/25% (m/m); e tempo de reação de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 h, sob as seguintes condições reacionais: Etanol, mistura dos óleos e KOH (razão molar 34:6:1). Obtiveram como proporção ótima a mistura contendo até 25% em peso de óleo de mamona apresentando rendimento relativamente elevado (82%). Os autores afirmam a viabilidade da produção industrial de biodiesel na proporção mamona/soja 25/75 % (m/m).

3.2. Parâmetros de Qualidade do Biodiesel: determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos

O glicerol é um co-produto da reação de transesterificação de óleos e

gorduras. A presença de glicerol livre e combinado, dependendo principalmente do processo técnico de transesterificação, é o principal parâmetro para a definição da qualidade do biodiesel.¹²

Altas concentrações de glicerol no biodiesel provocam problemas de armazenamento, pois quando o biodiesel é misturado com o petrodiesel, ocorre à separação do glicerol nos tanques de estocagem. Problemas como formação de depósitos, entupimento dos bicos injetores do motor e emissão de aldeídos também estão relacionados com a alta concentração de glicerol no biodiesel. O glicerol livre residual pode ser facilmente eliminado através de lavagens do biodiesel. Mesmo sendo praticamente insolúvel no biodiesel, o glicerol pode ser encontrado disperso na forma de gotículas. Há ainda a interferência causada pela reação de saponificação que ocorre em paralelo a transesterificação, aumentando a concentração de glicerina no biodiesel devido à formação de emulsões. Como os limites de glicerol livre (GL), glicerol total (GT) e glicerídeos são muito baixos há uma necessidade de métodos analíticos precisos e confiáveis para a determinação de glicerol livre e total, bem como glicerídeos.

^{12, 32}

O glicerol combinado, que inclui mono-, di-, e triglicerídeos, é proveniente da reação incompleta dos glicerídeos, logo, este é um importante parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a eficiência da conversão de óleos e gorduras em biodiesel. Aplicando-se fatores de conversões individuais baseados na massa molar média dos ácidos graxos que participam da composição da matéria-prima e concentrações de mono-, di- e triglicerídeos pode-se calcular o glicerol combinado.¹² A soma da concentração do glicerol livre com o glicerol combinado é denominado glicerol total.

3.2.1. Métodos de referência para a determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos

No Brasil o órgão responsável pela determinação e fiscalização da qualidade do biodiesel é a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), através das especificações contidas na Resolução -

RE nº 14 de 11 de maio de 2012, elaboradas com base nas normas: American Society for Testing and Materials ASTM D 6751 dos Estados Unidos da América e European Standard 14214 da União Européia, ambas para B100.¹³

As tabelas 4 e 5 apresentam, respectivamente, os métodos de referência e os limites máximos de resíduos permitidos para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicérides no biodiesel estabelecidos pela ANP 14/2012, ASTM D 6751 e EN 14214.

Tabela 4. Métodos de referência para análise de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel de acordo com os padrões ANP 14/2012, ASTM D 6751 e EN 14214

Parâmetro	ANP 14/2012	ASTM D 6751	EN 14214
	Método	Método	Método
Glicerol livre	ABNT NBR 15341		
	EN 14105	ASTM D 6584	EN 14105
	EN 14106		EN 14106
	ASTM D 6584		
Monoglicerídeos	ABNT NBR 15342		
	EN 14105	ASTM D 6584	EN 14105
	ASTM D 6584		
Diglicerídeos	ABNT NBR 15342		
	EN 14105	ASTM D 6584	EN 14105
	ASTM D 6584		
Triglicerídeos	ABNT NBR 15344		
	EN 14105	ASTM D 6584	EN 14105
	ASTM D 6584		
Glicerol total	ABNT NBR 15344		
	EN 14105	ASTM D 6584	EN 14105
	ASTM D 6584		

Os métodos de referencia ASTM D 6584 e EN 14105 possibilitam a determinação simultânea de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em

ésteres metílicos de ácidos graxos derivados de óleo de colza e oleaginosas com composição química semelhantes a mesma, empregando a técnica de cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama, injetor *on-column*, modo de injeção *simple on column*, quantificação por meio de curva de calibração com padronização interna e a reação de derivatização como preparo de amostra devido a baixa volatilidade e estabilidade térmica desses compostos que interagem por ligações de hidrogênio com os grupos silanóis da fase estacionária da coluna levando a sua não eluição.^{33,34}

Os métodos de referência ABNT NBR 15341 e NBR 15342, também empregam GC-FID, injetor *on-column*, e modo de injeção *simple on column*, porém à ambos os métodos não se derivatiza a amostra. O método ABNT NBR 15344 também se difere dos demais por determinar o teor de glicerol total e triglicerídeos por volumetria, onde faz-se a lise dos triglicerídios presentes no biodiesel, gerando glicerina que é posta a reagir com ácido periódico, o excesso deste é determinado por iodometria. Cabe salientar que os métodos ABNT NBR: 15341, 15342 e 15344 foram desenvolvidos para determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em ésteres metílicos de ácidos graxos derivados do óleo de mamona, no entanto, os três métodos podem ser aplicados a ésteres derivados de qualquer oleaginosa.¹³

Tabela 5. Teor máximo permitido para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel de acordo com as normas ANP 14/2012, ASTM D 6751 e EN 14214

Parâmetro	ANP 14/2012	ASTM D 6751	EN 14214
	Limite	Limite	Limite
Glicerol livre	0,02% (m/m) máx	0,02% (m/m) máx	0,02% (m/m) máx
Monoglicerídeos	Anotar	---	0,8% (m/m) máx
Diglicerídeos	Anotar	---	0,2% (m/m) máx
Triglicerídeos	Anotar	---	0,2% (m/m) máx
Glicerol total	0,25% (m/m) máx	0,24% (m/m) máx	0,25% (m/m) máx

3.2.2. Reação de derivatização para a determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel

A derivatização é um processo químico muito usado para modificar compostos com o objetivo de torná-los mais voláteis e termicamente estáveis, melhorando assim suas propriedades cromatográficas.^{35,36}

Em cromatografia gasosa as principais técnicas de derivatização são: sililação, alquilação, acilação, formação de derivados cíclicos e derivatização quiral. Os derivados silil são os mais amplamente utilizados para aplicações em GC. São formados, em sua maioria, pela substituição dos prótons ativos nos grupos -OH, -SH e -NH, por um grupo alquil silil, sendo estes derivados mais voláteis, menos polares e termicamente mais estáveis do que os compostos

que lhes deram origem. A trimetilsililação é a reação mais utilizada na reação de derivatização.^{37, 38}

Estudos sobre a derivatização de glicerol e glicérides através da reação de sililação foram realizados testando diferentes agentes derivatizantes. Segundos os autores, o melhor agente derivatizante foi o MSTFA a temperatura ambiente, usando piridina como catalisador e tempo de reação de 15 a 20 min.³⁸

A reação de sililação ocorre via ataque nucleofílico (SN2) ao agente sililante é fundamental a presença de um bom grupo de saída para melhorar o rendimento da reação (Figura 4). Geralmente os produtos da reação são mais voláteis e termicamente estáveis, além de não necessitarem de etapa de purificação podendo ser injetados diretamente no GC.^{39, 60}

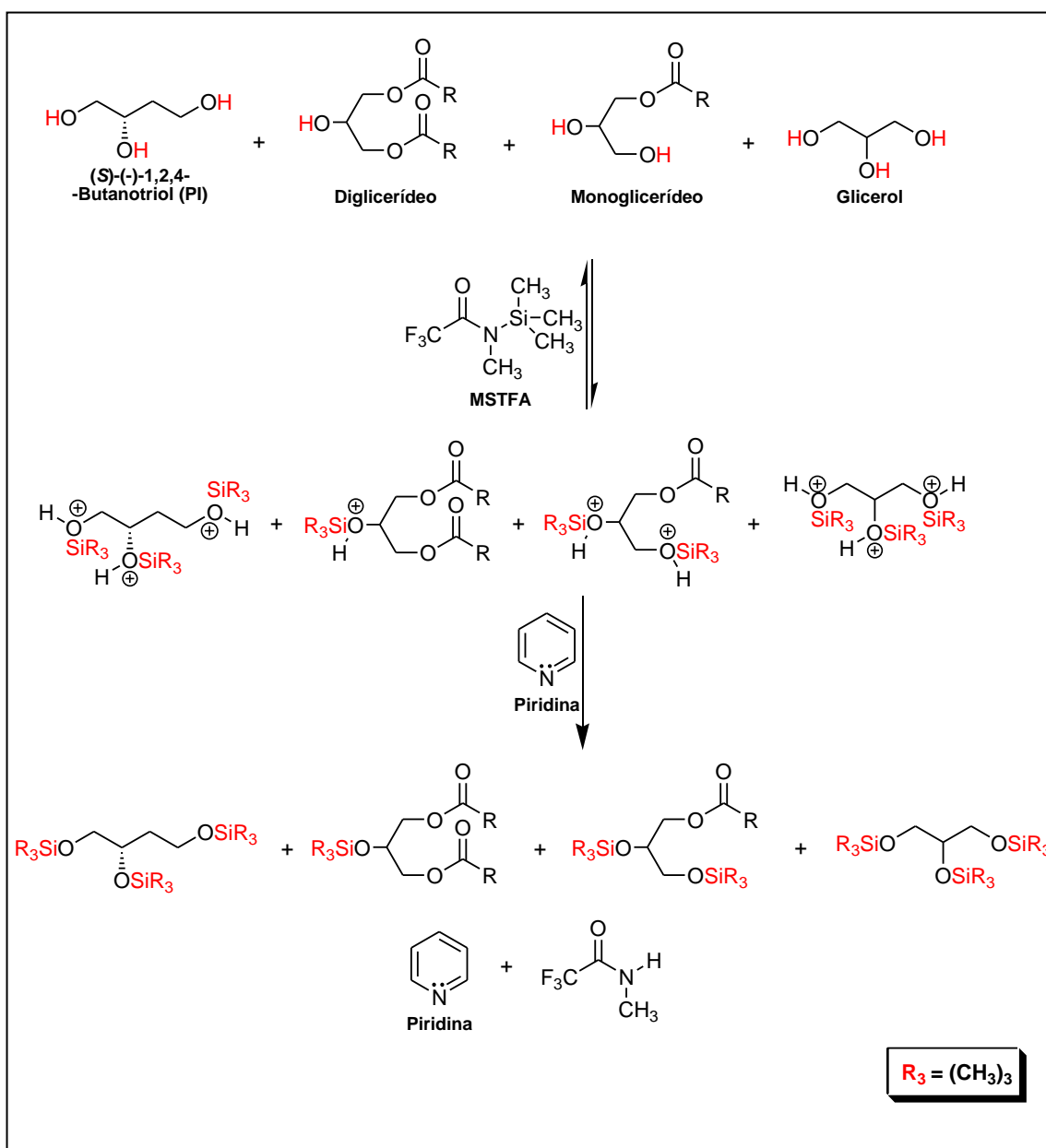


Figura 4. Representação da reação de silição para análise de glicerol e glicerídeos

3.2.3. Outros métodos para determinação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos

A partir da década de 1980 vários outros métodos são descritos na literatura para determinar glicerol e glicerídeos em biodiesel. O primeiro método

cromatográfico para análise de ésteres metílicos, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel empregou TLC (Cromatografia de camada fina, do inglês *Thin Layer Chromatography*) com detecção por FID, o método mostrou-se pouco preciso, sensível à umidade e alto custo.^{40, 41} Logo após, um método rápido para determinação de ésteres, mono- di- e triglicerídeos empregando GC-FID foi desenvolvido para monitorar a eficiência da reação de transesterificação do óleo de soja. As soluções padrão contendo linoleato de metila, mono-, di- e trilinoleína e a amostra foram derivatizadas com BSTFA (*N*, *O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida) antes de serem analisadas. A vantagem desse método foi a rápida separação cromatográfica do éster e dos mono-, di- e triglicerídeos que ocorreu em 12 min.⁴²

O primeiro método desenvolvido aplicando a técnica de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) para monitorar a transesterificação empregou detecção por densidade (DD do inglês *Density Detection*), o que permite a determinação do teor total de tri-, di-, e monoglicerídeos em amostras de biodiesel. De acordo com os autores, este método é simples e viável.⁴¹

Também foram avaliados para análise de glicerol livre por GC os sistemas de detecção FID e MS (espectrometria de massas do inglês *mass spectrometry*), a análise foi realizada após siliilação com BSTFA. Segundo os autores, o método apresentou excelentes resultados para quantificação, outra vantagem está na detecção por MS que evita a sobreposição de picos, permitindo o uso de colunas mais curtas.^{41,43}

O estudo realizado para determinação simultânea de glicerina livre, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel por GC-FID e usado como base para o desenvolvimento das normas oficiais ASTM D 6584 e EN 14105, investigou também diferentes derivatizantes, o melhor resultado foi obtido com o MSTFA, foi empregada calibração externa com soluções padrões de glicerol, mono-, di- e trioleína, e padronização interna com (*S*)-1,2,4-butanotriol e tricaprina.^{38,41}

Há trabalhos que comparam diferentes sistemas de detecção para determinar os compostos em estudo. Como a aplicação da técnica de HPLC usando eluição com um gradiente em fase reversa que compara três diferentes

sistemas de detecção: APCI-MS (Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry* com Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), ELSD (Detecção por dispersão de luz por evaporação, do inglês *Evaporative Light Scattering Detector*) e UV (Detecção no Ultravioleta, do inglês *Ultraviolet Detector*). Estes sistemas de detecção são apropriados para a análise de misturas complexas devido à sua compatibilidade com o gradiente de eluição, o qual é necessário para uma boa resolução de ésteres de metila, mono-, di-, e os triglicerídeos. Segundo os autores, dentre os métodos comparados, o mais adequado para a análise de biodiesel foi APCI-MS.^{41,44} Há relatos na literatura de estudos comparativos também entre técnicas cromatográficas como GC e HPLC, o estudo do emprego de GC-FID, HPLC-ELSD e HPLC com PDA (Detecção por Arranjo de Fotodiodos, do inglês *Photodiode Array Detector*) para determinar o teor de glicerol livre em biodiesel obtidos de diferentes matérias-primas. Foi realizada uma análise de variância que mostrou não haver diferença estatística no teor de glicerol livre para as amostras de biodiesel analisadas ou uma diferença entre os métodos. O método desenvolvido a partir da técnica de HPLC é vantajoso em comparação a GC devido ao fato de não requerer a derivatização da amostra, ter menor tempo de análise, e é diretamente aplicável à biodiesel de diversas fontes.⁴⁵

A técnica de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC do inglês *size-exclusion chromatography*) foi aplicada a fim de determinar simultaneamente os teores de mono-, di- e triglicerídeos, além de ésteres metílicos, ácidos graxos, glicerina livre e metanol em biodiesel de girassol retiradas diretamente do reator com o objetivo de monitorar a reação de transesterificação. Apenas um pico cromatográfico foi obtido para cada tipo de compostos, o qual resultou em uma quantificação fácil e precisa destes compostos. No entanto, o elevado custo das colunas SEC pode ser um limitante para a aplicação deste método em análises de rotina.⁴⁶

Para determinação de mono-, di-, triglicerídeos e glicerol residual em biodiesel foi desenvolvido um método por MS empregando ESI (Ionização por Eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*) que também possibilita

determinar impressões digitais e tipificação do biodiesel, a identificação de álcool, e monitorização da degradação e da adulteração. A tipificação e degradação do biodiesel foram realizadas no modo de íon negativo (ESI-), ao passo que os outros parâmetros foram determinados utilizando íon no modo positivo (ESI+). Esta técnica permite tanto a tipificação e rastreio rápido de alguns parâmetros importantes relacionados com a qualidade do biodiesel.^{41,47}

A técnica de Eletroforese Capilar foi usada para a determinação de glicerol livre no biodiesel usando clivagem oxidativa com periodato. Como o glicerol é um poliálcool, ele reage com periodato produzindo formaldeído, ácido fórmico e iodato. A quantidade de iodato produzido na reação é determinada pela técnica de eletroforese capilar. O tempo de análise total foi inferior a 28 s, obtido usando o modo de injeção de curto termo. A escolha dos componentes do eletrólito de execução e do padrão interno (nitrato) foi feita através da utilização de curvas de mobilidade eficazes. Um bom coeficiente de correlação maior do que 0,9991 e baixo LOD 4,3 mg L⁻¹ foi obtida e a recuperação do glicerol livre foi 95,4-102,4%, portanto o método desenvolvido mostrou-se satisfatório.⁴⁸

3.3. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é uma técnica utilizada para separação de gases ou substâncias volatilizáveis, trabalha a altas temperaturas exigindo que os compostos a serem analisados sejam voláteis e estáveis termicamente. Portanto, compostos não-polares são mais fáceis de determinar do que os polares, já os iônicos não podem ser analisados por GC. Com isso, substâncias contendo grupos funcionais fortemente polares e/ou alta massa molar, podem ser analisadas por essa técnica desde que sejam derivatizadas, transformando essas substâncias em compostos volatilizáveis e termicamente estáveis.^{49,50}

A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa), os processos físicos envolvidos na separação são: adsorção ou absorção (partição). A fase estacionária, sendo um sólido ocorre a adsorção

dos compostos e no caso de ser um líquido ocorre a partição.

A amostra, por meio de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. As colunas capilares são amplamente utilizadas nas análises por GC, são estreitas e compridas, oferecem maior resolução, menores tempos de análise, necessita de menores quantidades de amostra e maior sensibilidade do que as colunas empacotadas. O uso de temperaturas convenientes no local de injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização dessas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. Em colunas capilares diferentes modos de injeção são utilizados e também diferentes injetores, como do tipo com divisor/sem divisor da amostra (S/SL do inglês *split/splitless*), onde a divisão da amostra é realizada de acordo com a taxa split escolhida, e injetores on column, onde a amostra é injetada diretamente na coluna, com modos de injeção a frio (cold-on column) e vaporização com programação de temperatura (OCI/PTV, do inglês *On Column Injector/ Programmed Temperature Volatilisation*).^{49, 51}

O uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação da substância. O detector por ionização em chama (FID do inglês *Flame Ionization Detector*) tem por princípio a combustão dos compostos em uma chama e é muito utilizado devido aos seus níveis de detectabilidade e resposta quase universal.⁴⁹ Portanto, compostos orgânicos, como o biodiesel, são detectados pelo FID, sendo o GC-FID indicado para análises de biodiesel pelos órgãos normatizadores: American Society for Testing and Materials (ASTM), European Committee for Standardization (EN) e Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e do Biocombustível (ANP).

3.4. Parâmetros analíticos da validação

O procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis. Uma questão de suma importância no delineamento das etapas

a comporem o procedimento de validação de um método analítico está justamente no estabelecimento dessas etapas. A validação de um método desenvolvido, ou mesmo, a validação de modificações de ajuste de métodos já publicados, mesmo os oficiais, envolve uma etapa crítica que é o julgamento do nível de validação necessário conforme o objetivo a que se destina o método analítico. As diferentes agências reguladoras sugerem diferentes classificações para os níveis de validação de um método conforme a proposta que se destina o emprego do método.⁵²

A ANVISA e o INMETRO são os órgãos credenciados fiscalizar os laboratórios de ensaios no Brasil, através dos guias Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de fevereiro de 2010, orientam sobre validação de métodos analíticos e estabelecem parâmetros a serem seguidos como limite de detecção, limite de quantificação, curva analítica, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, robustez, efeito matriz entre outros são indicados para a validação de métodos.^{53, 54}

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Equipamentos

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos: placa de aquecimento e agitação magnética da marca Fisatom MOD 752; balança analítica marca Shimadzu modelo AY220; balança semi-analítica Shimadzu modelo BL 3200H; bomba de vácuo marca Quimis, vazão 60 L min⁻¹, potencia 1/SHP; rota evaporador marca Fisatom modelo 801; balança analítica Bioprecisa modelo FA 2104N.

4.2. Materiais e vidrarias

Para síntese do biodiesel foram utilizados balões de fundo chato e de fundo redondo com capacidade de 250 mL; erlenmeyers com capacidade de 125, 250 e 500 mL; funil de Büchner; Kitassato com capacidade de 500 mL; vidro de relógio; pinças; pipetas de Pasteur, graduada e volumétrica; funil de separação com capacidade de 250 mL; condensador; e banho de silicone.

Para o preparo das soluções estoque, trabalho e preparo de amostra utilizou-se: micro-seringas com capacidade de 10, 50 e 250 µL, da marca Hamilton CO,(Reno, Nevada, EUA); balões volumétricos com capacidade de 10 e 25 mL; micropipetadores automáticos com capacidade variável (10 – 5000 µL) (Labmate, Polônia, Digipet); pipetas de Pasteur; frascos com capacidade de 2 mL para amostrador automático; frascos âmbar com capacidade de 10 e 20 mL com tampa.

4.3. Sistema de Titulação Potenciométrica

Para determinação do índice de acidez do biodiesel produzido utilizou-se um titulador potenciométrico da marca Metrohm modelo Titrino plus 848, equipado com agitador magnético modelo 801 Ti Stand e eletrodo (de vidro) de

referencia e combinado.

4.4. Sistema Cromatográfico

Para a análise do biodiesel produzido foi utilizado um equipamento modelo GC-2010 da Shimadzu; equipado com detector por ionização em chama (FID); injetor do tipo *on-column*; injetor do tipo *split/splitless*; forno com capacidade de realizar programação de temperatura; e amostrador automático. Colunas capilares de sílica fundida: 5% fenildimetilpolisiloxano e dimensões 25 m x 0,32 mm x 0,1 µm HT-5 marca SGE; 100% dimetilpolisiloxano e dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm RTX-1 marca Restek. Sistema para aquisição de dados através do software *Shimadzu GC solution*. Os gases usados no sistema cromatográfico foram: hidrogênio, nitrogênio, e ar sintético, todos da marca White Martins, grau 5.0 analítico e pureza de 99,999%.

4.5. Reagentes e solventes

4.5.1. Reagentes e solventes para síntese

Os reagentes empregados para a síntese do biodiesel foram: óleo de ricino grau medicinal, Delaware LTDA, Porto Alegre, RS, Brasil; óleo de soja grau alimentício, Soya; álcool metílico P.A., Synth; álcool etílico P.A, Synth; hexano P.A, Synth; hidróxido de sódio P.A, Synth; sulfato de magnésio P.A, Synth; água destilada; e carbonato de sódio P.A, Synth; sílica gel F254.

4.5.2. Reagentes e solventes analíticos

4.5.2.1. Padrões analíticos

Para o preparo das soluções analíticas foram utilizados os seguintes padrões: glicerol, pureza $\geq 99,5\%$, Sigma-aldrich, USA; tricaprina (1,2,3 – tridecanolilglicerol)- padrão interno, pureza 99%, Sigma-aldrich, USA; monooleína (1-mono[cis-octadecenoil] –glicerol), pureza aprox.99%, Sigma-aldrich, USA; dioleína (1,3-di[cis-octadecenoil]-glicerol), pureza 99%, Sigma-aldrich, USA; (S) - (-) -1,2,4- butanotriol (padrão interno), pureza 98% GC, Fluka, USA.; *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida, Sigma-aldrich, USA; ricinoleato de metila, pureza 99%, Sigma-aldrich, USA; linoleato de metila, pureza $\geq 99\%$, Sigma-aldrich, USA; oleato de metila, pureza 99%, Sigma-aldrich, USA; esteárate de metila, pureza $\geq 99\%$, Sigma-aldrich, USA; palmitato de metila pureza 99%, Sigma-aldrich, USA; linolênato de metila, pureza $\geq 99\%$, Sigma-aldrich, USA; eicosanoato de metila, pureza 99%, Sigma-aldrich, USA; miristato de metila, pureza $\geq 99,5\%$, Fluka, USA; heptadecanoato de metila, pureza $\geq 99\%$, Fluka, U.S.A; tetracosanoato de metila, pureza $\geq 99\%$, Fluka, U.S.A.

4.5.2.2. Solventes analíticos

Para preparo das soluções analíticas, preparo da curva analítica e amostra foram empregados os seguintes solventes: piridina, grau HPLC e espectrofotométrico, J.T.Barker, U.S.A; heptano, grau HPLC e espectrofotométrico, J.T.Baker, EUA; hexano, grau HPLC e espectrofotométrico, J.T.Baker, EUA;

4.6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.6.1. Cálculos da massa molecular do óleo de soja (Regra de Kay)

Para o cálculo da massa molecular do óleo de soja, equação 1, foram utilizados os principais ácidos graxos constituintes deste com base no perfil graxo encontrado na literatura (Tabela 6).⁵⁵ Já para o óleo de mamona considerou-se a massa molecular da ricinoleína, por constituir em média 90% do óleo de mamona. E para a mistura mamona e soja na proporção 30% óleo de mamona e 70% óleo de soja foi aplicada a regra de três a partir da massa molar dos dois óleos puros.

$$M = \frac{1}{\sum Z_i/M_i} \quad (1)$$

Onde:

Z_i = massa de i , onde i é o ácido graxo correspondente

M_i = massa molecular de i (g mol^{-1})

Tabela 6. Dados para obtenção da massa molecular do óleo de soja

Ácido graxo (%)	Massa molecular (g mol^{-1})	
Linoleíco, C18:2	50,5	879,38
Oléico, C18:1	25,8	885,43
Palmítico, C16:0	11,3	807,32
Linolênico, C18:3	6,8	841,48
esteárico, C18:0	4,6	891,48

$$M = \frac{1}{\left(\frac{0,505}{879,38}\right) + \left(\frac{0,258}{885,43}\right) + \left(\frac{0,113}{807,32}\right) + \left(\frac{0,068}{841,34}\right) + \left(\frac{0,046}{891,48}\right)} = 945,88$$

$$M = 945,88 \text{ g mol}^{-1}$$

Para o óleo de mamona, a massa molecular utilizada foi de $933,43 \text{ g mol}^{-1}$, e para a mistura dos óleos de mamona e soja na proporção 30:70% (m/m) foi de $942,15 \text{ g mol}^{-1}$.

4.6.2. Síntese de Biodiesel

Todas as reações foram realizadas conforme o método desenvolvido por D'Oca e colaboradores utilizando o processo em duas etapas: Etapa I, transesterificação alcalina seguida da adição “*on pot*” de H_2SO_4 e a Etapa II, esterificação ácida.⁷

- **Etapa I:** transesterificação alcalina de 100 g óleo de mamona ou soja ou mistura de ambos na proporção 30:70% (m/m) em balão de fundo redondo, com capacidade para 250 mL, equipado com um condensador e um agitador magnético, respectivamente. Uma mistura de óleo e álcool (metanol ou etanol) com razão molar 6:1, respectivamente, foi aquecida a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h com hidróxido de sódio 1,0% m/m (com base na massa de óleo). Após, adicionou-se ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, a temperatura da reação foi mantida durante 0,5 h. A mistura foi filtrada a vácuo através de um funil de Büchner e, em seguida, o filtrado foi deixado durante um período mínimo de 5 h, em um funil de separação. As fases superior contendo ésteres e inferior glicerina foram separadas. O excesso de álcool em cada uma das fases foi removido por evaporação em evaporador rotativo.⁷

- **Etapa II:** A esterificação dos ácidos graxos contidos na fase superior (biodiesel) proveniente da etapa I foi realizada em balão de fundo chato, com capacidade de 250 mL, equipado com um condensador e um agitador magnético, respectivamente. Durante a reação, os ácidos graxos foram esterificados usando razão molar 60:1 (álcool: AG), e ácido sulfúrico 5-10% m/m (com base na massa de ácido graxo), a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h. Quando a reação foi completada os ésteres foram purificadas por lavagem com uma solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 1% para remover os sais inorgânicos residuais, e com água destilada a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ até que o pH final do meio ficasse em torno de 7,0. Então a fase orgânica foi separada e foram

adicionados 30 mL de hexano e sulfato de magnésio (MgSO_4), a solução orgânica foi agitada, filtrada e o hexano foi evaporado. Ao final foi medido o índice de acidez do biodiesel utilizando titulador potenciométrico.⁷

4.6.3. Análise por cromatografia em camada delgada

A conversão dos triglicerídeos em ésteres metílicos ou etílicos foi acompanhada por CCD utilizando placa cromatográfica contendo sílica gel como fase estacionária (60 F254 E Merck). Utilizou-se óleo de soja, mamona e da mistura mamona:soja (30:70) como referência e fase móvel: mistura de hexano e acetato de etila na proporção de 70:30 (v/v), respectivamente. A placa cromatográfica foi revelada com vapor de iodo.⁷

4.6.4. Determinação do índice de acidez

O índice de acidez foi determinado segundo o método ABNT NBR 14448 regulamentado pela ANP.⁵⁶

Para titulação foi empregado como titulante a solução de KOH 0,1 mol L⁻¹ em isopropanol, e os solventes diluentes da amostra foram tolueno, isopropanol e água na razão molar 1:0,95:0,5 respectivamente.

As titulações foram realizadas em béquer com capacidade para 100 mL, foi adicionado 5g de amostra, e então diluídas em 50 mL da solução diluente na razão molar tolueno:isopropanol:água (1:0,95:0,5), foi titulada somente a mistura de solventes diluentes e considerada como branco. Logo depois de obtido o valor do branco, titulou-se a amostra diluída, os índices de acidez foram calculados de acordo com a equação (2):

$$IA = \frac{(EP1 - CV01) \times 5,61 \times \text{Titter}}{C00} \quad (2)$$

onde:

5,61 = Produto da multiplicação da massa molar de KOH pela concentração

(0,1 mol L⁻¹).

EP1 = Volume gasto na titulação da amostra

CV01 = Volume gasto na titulação do branco

Titter = Fator de correção da concentração de KOH

C00 = massa de amostra

4.6.5. Preparo das soluções padrões

- Preparo das soluções padrão para determinação de glicerol livre e total e glicerídeos: todas as soluções estoque foram preparadas em piridina conforme as concentrações apresentadas na Tabela 7.⁵⁷

Tabela 7. Concentrações das soluções estoque em piridina

Soluções estoque	Concentração (mg mL ⁻¹)
Glicerol	0,5
Monooleína	5,0
Dioleína	5,0
Trioleína	5,0
(S)- (-)-1, 2, 4-Butanotriol (padrão interno)	1,0
Tricaprina (padrão interno)	8,0

- Preparo das soluções padrão para determinação do teor de ésteres (EN 14103): para a determinação do teor de ésteres utiliza-se o padrão interno (PI) o heptadecanoato de metila (C17:0) na concentração de 10 mg mL⁻¹. Esta solução analítica foi preparada a partir do padrão sólido do C17:0 e diluído em *n*-heptano. Também foram preparadas as soluções estoque de C14:0, C17:0 e C24:0 em *n*-heptano, na concentração de 1 mg mL⁻¹. A partir das soluções

estoque foi preparada uma solução trabalho composta pela mistura desses padrões na concentração final de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Então uma alíquota de $1 \mu\text{L}$ dessa solução foi injetada no sistema cromatográfico com a finalidade de obter um cromatograma e verificar seus respectivos tempos de retenção, pois todos os picos, da amostra, eluidos entre o C14:0 e o C24:0 são considerados ésteres.⁵⁸

- Preparo das soluções padrão para determinação do perfil de ácido graxo de acordo com a literatura os principais ácidos graxos constituintes do óleo de soja³⁵ e do óleo de mamona²⁹ são: C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 e C18:1-OH(12). A partir das respectivas soluções estoque, descritas na Tabela 8, foram preparadas soluções trabalho na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Após foi injetada uma alíquota de $1 \mu\text{L}$ de cada solução analítica no sistema cromatográfico para obtenção do tempo de retenção de cada padrão. Como não houve coeluição de nenhum dos padrões foi preparada uma mistura desses padrões na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$.

Tabela 8. Concentrações das soluções estoque em hexano.

Soluções estoque	Concentração (mg mL^{-1})
Palmitato de metila (C16:0)	1,0
Estearato de metila (C18:0)	1,0
Oleato de metila (C18:1)	4,0
Linoleato de metila (C18:2)	1,0
Linolenato de metila (C18:3)	2,0
Ricínoleato de metila (C18:1-OH)	2,0

4.6.5.1. Preparo da curva analítica

O preparo da curva analítica foi realizado conforme método de referência ASTM D 6584(Tabela 9).⁵⁷

Os procedimentos adotados para o preparo dos níveis das curvas analíticas foram: para medida de volumes inferiores a 40 μL foi utilizada microseringa de vidro de 50 μL ; para volumes superiores ou iguais a 50 μL foi utilizada microseringa de 250 μL . Após colocar em frascos âmbar volumes adequados dos padrões para todos os níveis foi adicionado a cada frasco 100 μL de MSTFA (reagente de derivatização) com micropipetador automático de 100 μL , e agitação manual. O tempo de reação de silição foi de 20 min sendo na seqüência adicionados duas vezes 4 mL de *n*-heptano com micropipetador automático de 5000 μL .

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

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

4.6.6. Preparo de amostra

4.6.6.1. Preparo de amostra para determinação do teor de GL e GT e glicerídeos

O preparo das amostras de biodiesel metílico de soja para determinação e quantificação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos foi realizado segundo o método de referência ASTM D 6584.⁵⁷ Enquanto que para o preparo das amostras de biodiesel metílico de mamona foi realizado com uma quantidade maior de reagente derivatizante segundo método validado por Dias e colaboradores.¹⁴ Para as amostras de biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) foi otimizado o volume de reagente derivatizante e validado o método.

4.6.6.2. Preparo de amostra para determinação do teor de ésteres

O preparo das amostras para determinação do teor de ésteres da mistura mamona e soja (30:70) foi realizado segundo método de referência EN 14103.61 A partir de 250 mg de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) foi adicionado 5 mL do padrão interno C17:0 (10 mg mL⁻¹).

4.6.6.3. Preparo de amostra para determinação do perfil de ácido graxo

Foram preparadas amostras de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) da seguinte forma: 2 µL de biodiesel foi diluído em 5 mL de hexano. As análises foram realizadas em triplicata de amostra, e cada amostra foi injetada três vezes no sistema cromatográfico.

4.6.7. Otimização da reação de derivatização utilizando MSTFA para o biodiesel metílico da mistura mamona e soja

Em 100 mg de biodiesel da mistura mamona e soja (30:70, m/m) foram adicionados 100 µL da solução estoque de (S)-(-)-1,2,4-butanotriol e 100 µL da

solução estoque de tricaprina. Em seguida foi adicionado 100 μL de MSTFA conforme indicado pelos métodos de referência para a sililação de biodiesel metílico de soja e/ou oleaginosas de composição química similar a soja.

Com a finalidade de obter o volume ideal de MSTFA necessário para derivatizar 100 mg de biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) visando a análise para determinação simultânea de glicerídeos, glicerol livre e total, foram testados os seguintes volumes de MSTFA: 120, 140, 160, 180 e 250 μL . Após a adição do reagente derivatizante, as amostras foram agitadas por 20 min transcorrido esse tempo as reações foram paradas com a adição de 8 mL de *n*-heptano para cada amostra.

Logo após, foram testados os seguintes volumes de MSTFA: 120, 140, 160, 180 e 250 μL . Após a adição do reagente derivatizante, as amostras foram agitadas e o tempo de reação de sililação foi de 20 minutos. Passado o tempo de sililação das amostras as reações foram paradas com a adição de 8 mL de *n*-heptano para cada amostra.⁵⁷

Para esses ensaios foram adotados os seguintes procedimentos: para volumes de 100 μL dos padrões internos foi utilizada micro-seringa de 250 μL ; para os volumes entre 100 e 250 μL de MSTFA foram utilizados micropipetadores automáticos de 100 e 250 μL ; e para os volumes de 8 mL (2x 4 mL) de *n*-heptano foi utilizado micropipetador automático de 5000 μL .

A escolha do volume ideal de MSTFA para sililação das amostras de biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) foi feita após aplicação de um *t*-test, teste de múltipla comparação de Tukey, usado para indicar a diferença significativa entre os volumes de MSTFA adicionados as amostras de biodiesel para derivatização, com nível de 95% de significância adotada para todas as comparações. O teste de Turkey permite a formação de intervalos de confiança 100 (1 - α)% simultâneos para todas as comparações em pares. No caso de $\alpha = 0,05$ há uma probabilidade de 0,05 ou 5% de que pelo menos um par das medições será falsamente considerado diferente.⁵⁹

4.6.8. Análises por Cromatografia em Fase Gasosa

4.6.8.1. Condições cromatográficas para determinação do teor de glicerol livre e total, mono, di, e triglicerídeos

As condições cromatográficas utilizadas para análise de glicerol livre e total, mono, di, e triglicerídeos basearam-se no método de referência ASTM D 6584, devido este método apresentar tempo de corrida menor que o método EN 14105. Além disso, o estudo realizado por Dias e colaboradores,¹⁴ comprovou ser indiferente a eluição de amostras de biodiesel pelos métodos EN 14105 e ASTM D 6584.

Para as determinações foi utilizado sistema GC- 2010 Shimadzu com autoinjeter AOC-20i, injetor *on-column*, técnica de injeção *simple on-column*, coluna capilar de sílica fundida HT-5 marca SGE - 5% fenil polisiloxano - carborano, com dimensões 25 m x 0,32 mm x 0,1 μm de espessura do filme; volume de injeção de 1 μL ; gás de arraste $\text{H}_{2(\text{g})}$ com velocidade linear de 50 cm s^{-1} ; temperatura do injetor 70 $^{\circ}\text{C}$ por 1min, 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 380 $^{\circ}\text{C}$ por 10,31 min. Programação de temperatura do forno cromatográfico: 50 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 180 $^{\circ}\text{C}$, 7 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 230 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 380 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Detecção por ionização em chama (FID) a 380 $^{\circ}\text{C}$ e com $\text{H}_{2(\text{g})}$ a 40 mL min^{-1} , ar sintético a 400 mL min^{-1} e $\text{N}_{2(\text{g})}$ a 30 mL min^{-1} como gás *make up*. Aquisição e processamento de dados com *software GC Solution Shimadzu*.

4.6.8.2. Condições cromatográficas para determinação do teor de ésteres e perfil graxo

Tanto o teor de ésteres como o perfil graxo do biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) foram determinados de acordo com o método de referência para determinação do teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (EN 14103).⁵⁸

Para as determinações foi utilizado sistema GC- 2010 Shimadzu com injetor *split*, temperatura do injetor 250 $^{\circ}\text{C}$, técnica de injeção *split-splitless*, coluna capilar de polietilenoglicol com dimensões 30 m x 0,25 mm d.i x 0,25 μm

de espessura do filme, marca RTX wax. As condições utilizadas foram: volume de injeção de 1 μL , gás de arraste $\text{H}_{2(\text{g})}$ Split: 54 mL/min; forno cromatográfico com isoterma à 200 °C. FID a 250 °C e com $\text{H}_{2(\text{g})}$ a 40 mL min^{-1} , ar sintético a 400 mL min^{-1} e $\text{N}_{2(\text{g})}$ a 30 mL min^{-1} como gás *make up*. Aquisição e processamento de dados com *Software GC Solution Shimadzu*.

4.6.9. Identificação e quantificação de mono-, di- e triglicerídeos

Para identificação e quantificação dos monoglicerídeos e diglicerídeos foram preparadas soluções analíticas correspondentes ao segundo nível de concentração da curva analítica da norma ASTM D 6584 para os padrões: monopalmitina, monoestearina, monolinoleína e dipalmitina, diestearina, respectivamente, a partir das soluções estoque de 5 mg mL^{-1} .

A identificação e quantificação dos monoglicerídeos e diglicerídeos para a amostra de biodiesel metílico de mamona foi realizada por meio da sobreposição dos cromatogramas das amostras de biodiesel metílico de soja, de biodiesel metílico de mamona e dos cromatogramas da mistura dos padrões de monoglicerídeos e de diglicerídeos. O mesmo procedimento foi realizado para a identificação dos monoglicerídeos e diglicerídeos referentes a amostra de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70).

Para os triglicerídeos foram estabelecidas bandas de tempos de retenção por meio da sobreposição de cromatogramas. Foram considerados quatro sinais cromatográficos referentes a C 16:0, C 18:0, C 18:1, C 18:2 e C 18:1-OH(12) para determinação das bandas de triglicerídeos para as amostras de biodiesel metílico de mamona e da mistura mamona e soja (30:70). Tanto para a amostra de biodiesel metílico de mamona como para a amostra de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) foi realizada a sobreposição dos seus respectivos cromatogramas com os cromatogramas do quinto nível de concentração dos padrões e o da amostra do biodiesel metílico de soja.

Os padrões analíticos para a monoricinoleína, diricinoleína e triricinoleína não estão disponíveis. Portanto, para identificação desses

glicerídeos oriundos de ésteres do óleo de mamona foram seguidos os seguintes requisitos: 1) o pico da monoricinoleína deve ser maior do que aos picos dos outros monoglicéridos presentes no biodiesel metílico de mamona; 2) o tempo de eluição deve ser maior ao tempo de retenção dos outros monoglicéridos; e 3) o pico deve estar ausente no cromatograma da amostra de biodiesel metílico de óleo de soja.¹⁴ Os requisitos considerados para a identificação da diricinoleína e triricinoleína foram os mesmos que foram usados para monoricinoleína em biodiesel metílico de mamona. No caso do biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) o requisito (1) não foi levando em consideração por esse biodiesel ser produzido somente com 30% de óleo de mamona, no entanto, foram sobrepostos o cromatograma do biodiesel de mamona com o da mistura mamona e soja e comparados os tempos de retenção para monoricinoleína, diricinoleína e triricinoleína.

4.6.10. Cálculos utilizados para quantificação

4.6.10.1. Cálculo para quantificação de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel

Para o cálculo do teor de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos, nas amostras de biodiesel, utilizou-se do auxílio do *software GC Solution Shimadzu*.

Primeiro foi verificada a linearidade das curvas analíticas. Em seguida, no “*software*” foi alterado o método modificado e alterado para “Manual RF (linear)”. O RF (fator de correção) dado para a monooleína foi copiado para os demais monoglicerídeos, da mesma forma que o RF da dioleína foi copiado para os demais diglicerídeos e o RF da trioleína foi copiado para os demais triglicerídeos. Desta maneira, foi possível quantificar os demais glicerídeos com as curvas analíticas da monooleína, dioleína e trioleína.

A razão entre a concentração de cada composto e a concentração do respectivo padrão interno na amostra é fornecida pelo *software GC Solution Shimadzu*, para determinar a concentração de cada composto o valor dado foi

substituído na Equação 3.

$$\text{Conc composto} = \frac{\text{Conc composto}}{\text{concPI}} \times \text{concPI} \quad (3)$$

A partir da Equação 3 foi determinada a concentração de glicerol livre, mono-, di- e triglicerídeos nas amostras. Os valores encontrados na Equação 3 foram substituídos na Equação 4 para determinar o teor de glicerol total.

$$\text{GT \% (m/m)} = \text{GL} + 0,2591 \text{ monoglicerídeos} + 0,1488 \text{ diglicerídeos} + 0,1044 \text{ triglicerídeos} \quad (4)$$

4.6.10.2. Determinação do teor de ésteres e perfil graxo

O perfil graxo e o teor de ésteres do biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) foram determinados utilizando as condições cromatográficas descritas na norma EN 14103.⁵⁸

O teor de ésteres foi calculado através do somatório das áreas dos picos compreendidos entre o C14:0 e o C24:0. Aplicando esse valor na Equação 5:

$$C = \frac{(\sum A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100 \quad (5)$$

onde:

$\sum A$ = soma das áreas dos picos;

A_{EI} = área do padrão interno;

C_{EI} = concentração do padrão interno C17:0 em (mg mL^{-1});

V_{EI} = volume de padrão interno (mg) usado em cada amostra;

m = massa da amostra (mg).

4.6.12. Validação do método

Para a validação do método analítico estudado neste trabalho foram

seguidas as orientações do INMETRO. Os parâmetros utilizados para a validação do mesmo foram: curva analítica; linearidade; exatidão através de ensaios de adição padrão e por ensaios de recuperação; precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária; robustez e efeito matriz.⁵³

4.6.12.1. Curva analítica e linearidade

A construção das curvas analíticas para o glicerol, monooleína, dioleína e trioleína está descrito no item 4.6.5. A Tabela 10 apresenta os cinco níveis de concentração para cada composto.

Tabela 10. Níveis de concentração segundo ASTM D 6584 para os compostos em % (m/m)⁵⁷

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

Foram utilizados como padrões interno (S)-(-)-1,2,4-butanotriol para o glicerol e tricaprina para os glicerídeos, nas concentrações 0,1 e 0,8% (m/m), respectivamente. Foram realizadas três injeções para cada nível de concentração no sistema cromatográfico. Depois de injetados todos os níveis de concentração o *software* construiu a curva analítica de cada composto relacionando a razão das áreas (área do padrão/área do padrão interno) com a razão das concentrações (conc. do padrão/conc. do padrão interno). A linearidade do método para cada composto foi avaliada com base nas respectivas curvas analíticas através do coeficiente de determinação (r^2).

4.6.12.2. Exatidão

Segundo métodos desenvolvidos e validados para análise de biodiesel por cromatografia gasosa, costuma-se realizar nove determinações no mínimo, de forma a contemplar o intervalo linear do método, ou melhor, três concentrações, baixa (limite de quantificação), média e alta, com três réplicas cada no mínimo (n=9).^{14, 60}

A exatidão foi avaliada através do método de adição padrão devido à impossibilidade de obtenção da matriz isenta dos compostos de interesse (glicerol, monooleína e dioleína), com exceção dos triglicerídeos, pois em todas as amostras de biodiesel analisadas não foram detectados a presença de triglicerídeos. Portanto, a exatidão para a trioleína foi avaliada por meio de ensaios de recuperação.

Para avaliação da exatidão pelo método de adição padrão o ideal é ter um material de referência acompanhado de um certificado com o valor da concentração de cada composto de interesse no biodiesel. Aplica-se diretamente nas Equações 6 e 7 os sinais medidos e o valor da concentração dado pelo material de referência.

No caso do biodiesel de mamona, não há material de referência. Então a concentração de cada composto na amostra não fortificada foi determinada como referência para o cálculo da exatidão; para garantir a confiabilidade esses valores foram também determinados através das curvas analíticas e comparados àqueles determinados pelo método de adição padrão. O método de adição de padrão foi aplicado baseando-se na figura 5.

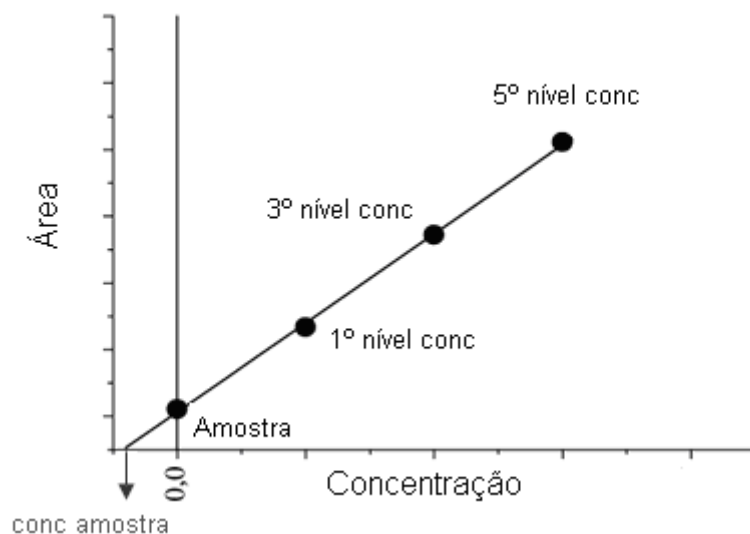


Figura 5. Modelo de curva utilizado no método de adição padrão

Com a extrapolação da reta foi possível encontrar a concentração na amostra, figura 5, no eixo das abscissas atribuiu-se a concentração na amostra não fortificada e substituiu-se na Equação 6.

$$C_f = \frac{cnf \times (af - anf)}{anf} \quad (6)$$

Onde:

C_f = concentração determinada da amostra fortificada

cnf = concentração da amostra não fortificada

af = área da amostra fortificada

anf = área da amostra não fortificada

Logo em seguida, o valor encontrado foi substituído na Equação 7.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{C_f}{\text{conc da fortif}} \times 100 \quad (7)$$

Como o padrão interno foi considerado no cálculo da exatidão, a reta, figura 5, relacionou-a a razão das áreas (área do padrão/área do padrão

interno) com a razão das concentrações (concentração do padrão/concentração do padrão interno). As razões das áreas e das concentrações entre padrão e padrão interno também foi levado em conta na Equação 6, onde o valor encontrado foi multiplicado pela concentração do padrão interno.

Para ensaios de recuperação o valor de área medido foi substituído nas equações de reta das curvas analíticas no solvente e na matriz, obtendo dessa forma a concentração na amostra fortificada (C_1). Após foram expressos conforme Equação (8).

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (8)$$

onde:

C_1 = concentração determinada na amostra fortificada

C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada

C_3 = concentração da fortificação

4.6.12.3. Precisão

Avaliou-se a precisão instrumental para os cinco níveis de concentração da curva analítica de cada composto, aplicando três injeções repetitivas de um mesmo ensaio.

O estudo da precisão do método, em termos de repetitividade e precisão intermediária, foi avaliada para o biodisel metílico da mistura mamona e soja (30:70) devido à otimização da reação de derivatização, volume ideal 160 μ L de MSTFA, realizada para o mesmo.

Foram realizados três ensaios para cada nível de concentração escolhido (1º nível, 3º nível, 5º nível) através da fortificação da amostra com concentrações conhecidas dos padrões, a partir de injeções realizadas em triplicata para cada ensaio, resultando em nove injeções para cada nível ($n=9$). Para avaliar a precisão intermediária, o procedimento foi realizado em dias diferentes.

A precisão foi expressa através da estimativa do desvio padrão relativo percentual (RSD%), Equação 9.

$$\text{RSD\%} = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (9)$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto

X_m = média de uma série de medidas (réplicas)

4.6.12.4. Robustez

Tendo em vista que os métodos de referência foram desenvolvidos para biodiesel metílico de colza e biodiesel de oleaginosas de composição química semelhante à colza, o estudo da robustez do método foi avaliado frente a variação química da matriz: biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) e biodiesel metílico de mamona.

4.6.12.5. Avaliação do efeito matriz

Foram construídas curvas no solvente e na matriz para avaliação da ocorrência ou não do efeito matriz para o biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70).

Para construção das curvas na matriz, em 0,1 g de amostra de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) foram adicionados de acordo com o método ASTM D 6584 volumes das soluções estoque dos padrões resultando em cinco níveis de concentração e 100 µL de cada padrão interno, em seguida foi realizada a reação de sililação com 160 µL de MSTFA, deixando reagir por 20 minutos e parando a reação com adição de 8 mL de *n*-heptano.

O cálculo para avaliação do efeito matriz foi realizado de acordo com a Equação 10.⁶¹

$$\text{Efeitomatriz\%} = \frac{\text{inclinação}(X_1) - \text{inclinação}(X_2)}{\text{inclinação}(X_2)} \times 100 \quad (10)$$

onde:

X_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada composto, preparadas no biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) (matriz).

X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada composto, preparadas em n-heptano (solvente).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir de métodos clássicos para produção de biodiesel de oleaginosas convencionais, foi desenvolvido no Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica (LKSO) um processo em duas etapas para a produção de biodiesel etílico de mamona.⁷ Este trabalho trouxe como inovação tecnológica a adição “*on pot*” de ácido sulfúrico, ao meio reacional, logo após o término da reação de transesterificação alcalina (etapa I), ocorrendo a quebra *in situ* do sabão formado pela reação de saponificação dos triglicerídeos (reação paralela a reação de transesterificação) tornando possível a separação de fases entre ésteres graxos derivados do óleo de mamona e o glicerol. Cabe salientar que, quando se utilizava óleo de mamona para produzir biodiesel via processos convencionais esta separação era dificultada devido a grande afinidade da glicerina pelas hidroxilas presentes no ácido ricínoleico (principal constituinte do óleo de mamona) e a formação de sabão no meio reacional. Além disto, a maior solubilidade dos ésteres derivados do ácido ricínoleico no álcool usado para a transesterificação também dificulta a separação. Este mesmo processo foi testado pelo grupo para produção de biodiesel etílico de girassol,⁶² obtendo bons rendimentos e redução dos efluentes provenientes das lavagens para remoção do sabão.

De acordo com os objetivos deste trabalho aplicou-se o método para produção de biodiesel etílico de mamona desenvolvido em nosso laboratório⁷ à mistura das oleaginosas mamona e soja na proporção 30:70% (m/m), respectivamente. A figura 6 apresenta o fluxograma do processo em duas etapas e a figura 7 mostra as reações envolvidas no processo:

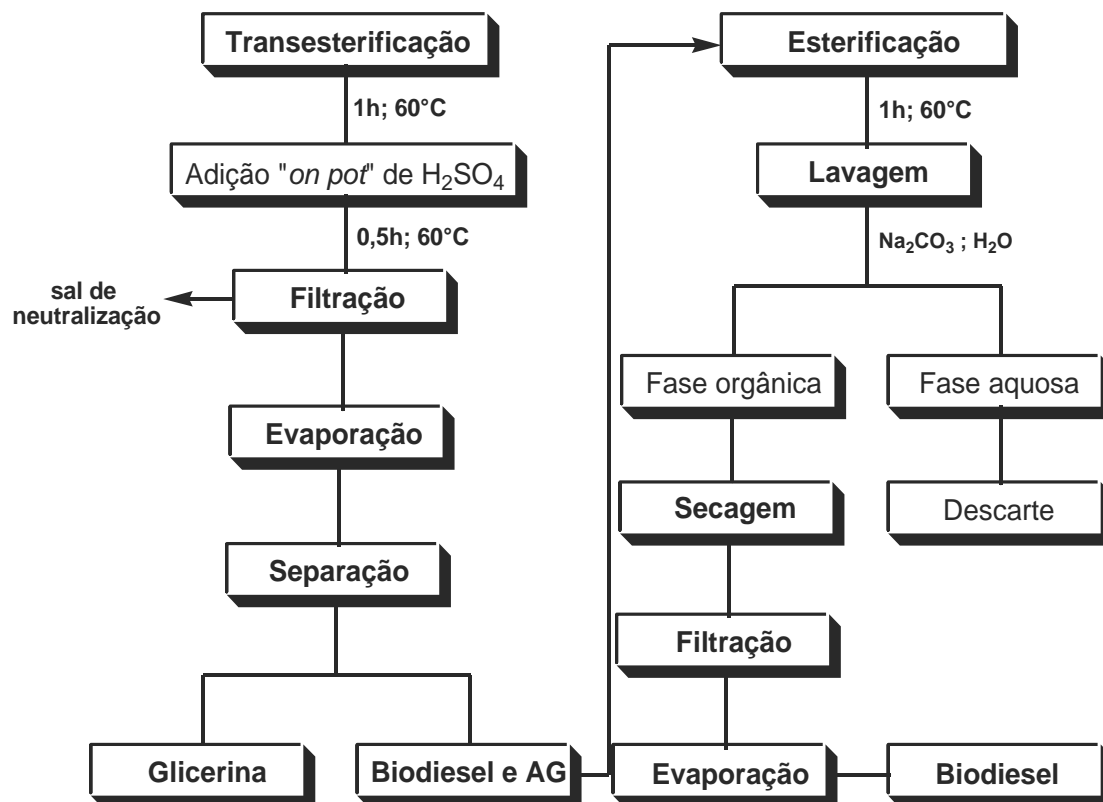


Figura 6. Fluxograma do processo desenvolvido em nosso laboratório para a síntese de biodiesel de mamona

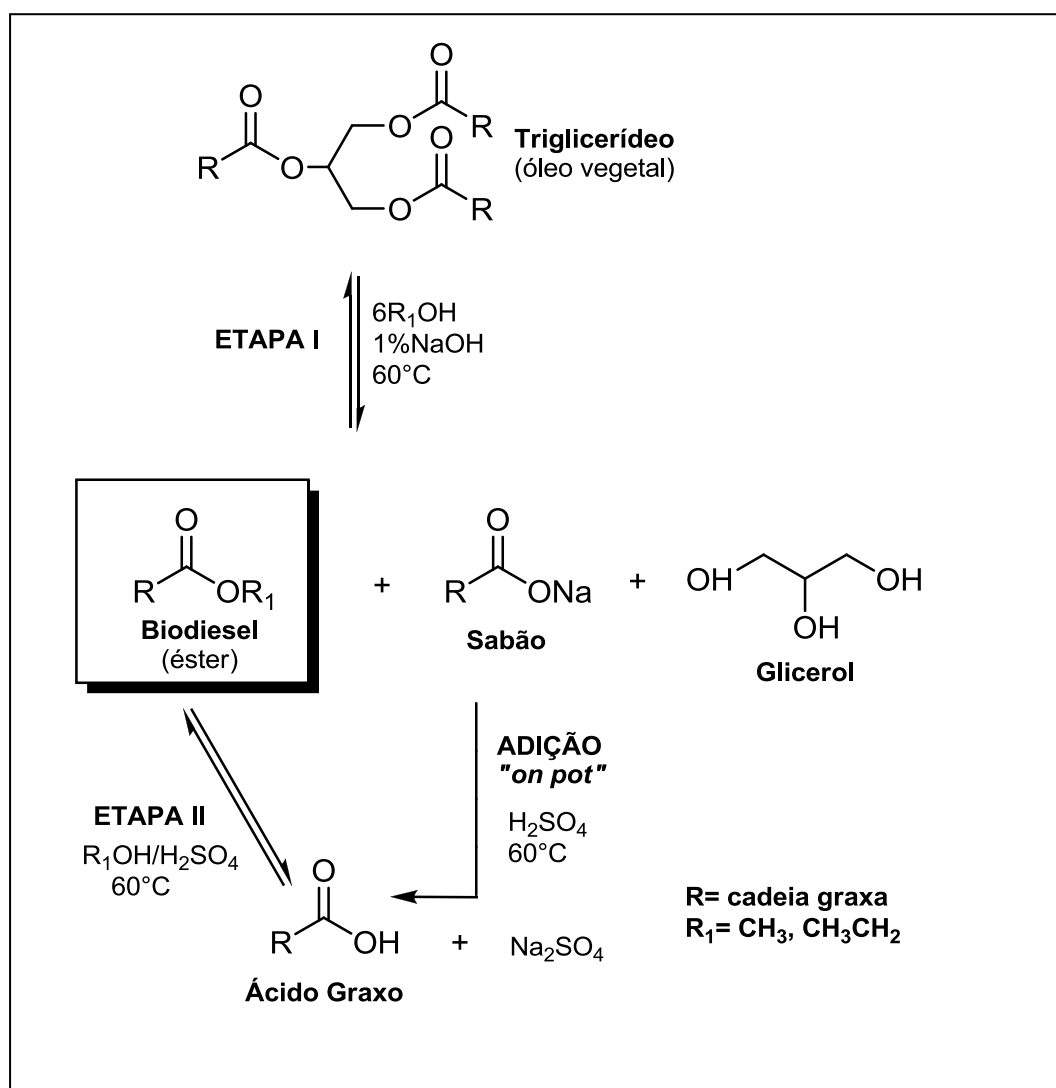


Figura 7. Síntese desenvolvida no LKSO para produção de Biodiesel etílico e metílico utilizando a adição ‘on pot’ de ácido sulfúrico

5.1. Síntese do biodiesel

As amostras de biodiesel de soja e de mamona foram produzidas por via etílica e metílica, utilizando o processo em duas etapas, com 100 g óleo de soja e 100 g de óleo de mamona, respectivamente, a fim de monitorar e comparar a eficiência do método para essas oleaginosas com metanol e etanol, visando à obtenção de informações sobre separação, rendimento, IA e conversão antes de aplica-lo à mistura das mesmas. Estes resultados estão apresentados nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Condições reacionais, rendimentos e acidez após transesterificação alcalina, utilizando razão molar de álcool:óleo de 6:1 e 1% de NaOH, seguida da adição de H₂SO₄ (Etapa 1)

Reação	Óleo	Álcool	Rendimento em massa (g)			IA (mg g ⁻¹)
			Biodiesel	Glicerol	Sal	
1	Soja	EtOH	107,3	8,6	1,9	13,18
2	Soja	MeOH	99,2	10,3	1,6	7,99
3	Mamona	EtOH	110,3	3,00	1,6	13,44
4	Mamona	EtOH	102,6	7,8	2,4	12,86
5	Mamona	EtOH	103,3	9,6	1,3	13,82
6	Mamona	MeOH	102,3	6,6	1,7	14,41
7	Mamona	MeOH	102,8	4,7	1,5	13,52
8	Mamona	MeOH	101,1	7,7	1,3	13,13
			*	**	1,8	---

*Éster MeOH de soja = 100,6g e de mamona = 101,4g. Éster EtOH de soja = 105,5g e de mamona = 105,3g. **Glicerol: soja = 9,75g e mamona = 9,96g.

Os resultados apresentados na Tabela 11 são referentes ao rendimento em massa de biodiesel das reações com metanol e etanol para biodiesel de soja e mamona. As reações com óleo de mamona foram realizadas em triplicata para se observar a aplicabilidade do método frente às reações com etanol e metanol. O rendimento teórico para as reações com óleo de mamona e etanol, segundo balanço de massa, é de 105,3 g, o rendimento médio obtido nas reações foi de 105,4 g com desvio padrão de $\pm 3,5$ g, esses resultados demonstram a eficiência do processo, indica também a boa separação das fases FAEEs/glicerol. As reações com óleo de mamona pela rota metílica apresentaram rendimento médio de 102,1 g com desvio padrão de apenas $\pm 0,7$ g confirmando a aplicabilidade e eficiência do método para a produção de

biodiesel metílico de mamona. Cabe ressaltar a importância da adição “*on pot*” de H_2SO_4 para a separação das fases éster/glicerol e conseqüentemente na eficiência do processo. A separação é uma das maiores dificuldades na produção de biodiesel de mamona por métodos convencionais onde a formação de sabão é responsável pela ineficiente separação das fases éster/glicerol. Com a adição “*on pot*” de ácido sulfúrico logo após a etapa de transesterificação foi observada a separação imediata das fases que foi atribuída à conversão do sabão formado em ácido graxo livre e sal, representados na Figura 8.

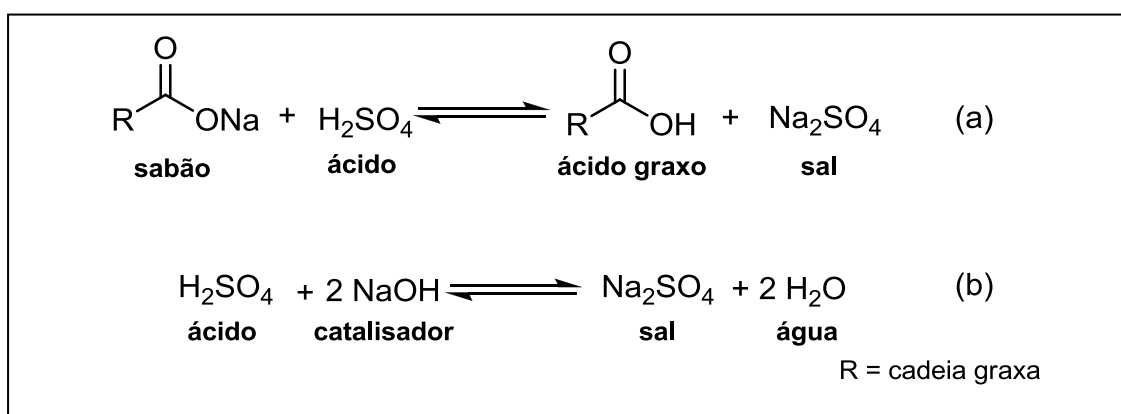


Figura 8. Conversão do sabão em ácido graxo (a); reação de neutralização do catalisador (b)

Após a filtração do sal os ácidos graxos presentes no biodiesel obtido ao final da primeira etapa, são esterificados (Etapa II) aumentando a conversão de biodiesel no processo e reduzindo drasticamente a acidez final. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Condições reacionais, índice de acidez e percentual de conversão de AGL após a esterificação (Etapa II), utilizando metanol:AG (mol:mol) 60:1 e 10% (m/m) de H₂SO₄

Reação	Éster	IA _i (mg g ⁻¹)	Álcool	IA _f (mg g ⁻¹)	Conversão*
1	Soja	13,18	EtOH	0,58	96
2	Soja	7,99	MeOH	0,14	98
3	Mamona	13,44	EtOH	1,55	88
4	Mamona	12,86	EtOH	4,23	67
5	Mamona	13,82	EtOH	3,48	75
6	Mamona	14,41	MeOH	0,69	95
7	Mamona	13,52	MeOH	0,25	98
8	Mamona	13,13	MeOH	0,81	94

* Conversão= 100 x (IA_i - IA_f) / IA_i

As conversões dos ácidos graxos em ésteres foram maiores para as reações com metanol, conversões >93%, do que as reações com etanol, que variaram de 67 a 96%. Considerando a reatividade do álcool no processo os resultados estão de acordo com a acidez relativamente mais elevada do grupo hidroxila do metanol em relação ao grupo hidroxila do etanol, resultando num maior efeito catalítico do álcool de cadeia mais curta, o metanol.⁶³ Além das elevadas conversões foram obtidas amostras (Tabela 12, reações 2 e 7) com índice de acidez final (IA_f) dentro dos limites exigidos pela ANP (0,50 mg g⁻¹ de KOH).

Portanto, o método mostrou-se eficaz também para a produção de ésteres metílicos e etílicos de soja e ésteres metílicos de mamona. A partir de então, aplicou-se o mesmo método à mistura dos óleos, 30 g de óleo de mamona e 70 g de óleo de soja, na presença de metanol. As reações foram

realizadas em triplicata para se observar a variação dos resultados, visto que não foi encontrado na literatura informações sobre separação, rendimento, IA e conversão para ésteres metílicos da mistura mamona e soja (30:70). Esses resultados estão nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Condições reacionais, rendimentos e acidez após transesterificação alcalina e adição de H_2SO_4 (etapa 1), utilizando metanol: TG (mol: mol) 6:1, para as reações com mistura de óleos mamona:soja (30:70)

Reação	Óleo	Álcool	Rendimento em massa (g)			IA ($mg\ g^{-1}$)
			Biodiesel	Glicerol	Sal	
9	^a M:S	MeOH	98,2	9,9	1,1	10,72
10	^a M:S	MeOH	99,6	10,3	1,6	11,02
11	^a M:S	MeOH	99,5	7,9	1,5	9,01
			100,5	9,8	1,8	---

^a mistura mamona e soja 30:70% (m/m).

Tabela 14. Condições reacionais, índice de acidez e percentual de conversão de AGL após a esterificação às reações com mistura (Etapa 2), utilizando metanol:AG (mol: mol) 60:1 e 10% (m/m) de H_2SO_4

Reação	Éster	IA _i ($mg\ g^{-1}$)	Álcool	IA _f ($mg\ g^{-1}$)	Conversão* (%)
9	M:S	10,72	MeOH	1,23	87
10	M:S	11,02	MeOH	1,24	89
11	M:S	9,01	MeOH	0,99	89

* Conversão= $100 \times (IA_i - IA_f) / IA_i$

O rendimento médio das reações foi muito próximo ao valor teórico (100,5 g), rendimento médio de 99,1 g com desvio padrão de 0,6 g, foram

obtidos rendimentos maiores que 98%. No que se referem à conversão dos ácidos graxos livres os resultados ficaram acima de 87%, reduzindo o índice de acidez final a valores próximos a 1 mg g^{-1} de KOH. Isso demonstra a viabilidade do processo aplicado frente à mistura de óleo de mamona e soja (30:70).

5.1.1. Variação das condições do método de produção de biodiesel

Após a realização das reações, as separações de fases éster/glicerol bem sucedidas, as altas conversões de AGL em ésteres confirmando a boa aplicabilidade do processo de produção de biodiesel desenvolvido por D'Oca e colaboradores na produção de ésteres metílicos de soja, mamona e da mistura mamona e soja (30:70). No entanto, algumas amostras foram encaminhadas para análise de glicerídeos, glicerol livre e total, obtendo concentrações acima do teor máximo permitido em biodiesel dos compostos analisados de acordo com as normas ANP 14/2012, ASTM D 6751 e EN 14214, principalmente os monoglicerídeos e diglicerídeos, esses intermediários são formados durante a reação de transesterificação.¹² Portanto, foram realizados testes visando a diminuição dos intermediários oriundos do processo de produção, do índice de acidez e o aumento da conversão de ácidos graxos livres em biodiesel. Para tanto, foi estudado o aumento da quantidade de catalisador (NaOH); a comparação entre catalisadores alcalinos (NaOH *versus* KOH); e o aumento no tempo de transesterificação. Os resultados do estudo estão descritos nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15. Condições reacionais, rendimentos e acidez após transesterificação alcalina e adição de H₂SO₄ (Etapa 1), utilizando metanol: TG(mol: mol) 6:1

Reação	Óleo	Catalisador	Cat. (%m/m)	tempo (h)	Rendimento em massa (g)			IA (mg g ⁻¹)
					Biodiesel	Glicerol	Sal	
15	Soja	NaOH	1	1	98,4	10,8	1,4	6,16
16	Mamona	NaOH	1	1	102,8	5,8	1,6	12,67
17	M:S	NaOH	1	1	98,4	8,9	1,9	11,66
24	Soja	NaOH	1	1,5	97,1	10,4	1,4	9,34
28	Mamona	NaOH	1	1,5	100,6	7,4	1,9	14,93
33	M:S	NaOH	1	1,5	99,3	10,1	1,1	12,14
18	Soja	NaOH	1,2	1	100,3	12,2	1,8	7,43
19	Mamona	NaOH	1,2	1	104	6,3	1,6	15,46
20	M:S	NaOH	1,2	1	97,8	8,6	2,0	16,05
21	Soja	KOH	1	1	100,4	10,7	1,4	2,6
22	Mamona	KOH	1	1	97,6	6,3	1,5	10,02
23	M:S	KOH	1	1	101,3	8,9	1,5	16,47
Massa Teórica					*	**	***	---

*Éster metílico: soja = 100,6 g, mamona = 101,37 g, mistura = 100,5 g. **Glicerol: soja = 9,75 g, mamoma = 9,96 g e M:S = 9,78 g. ***Sal partindo de 1% NaOH, para 100 g de TG = 1,78 g; 1,2% NaOH para 100 g de TG = 1,83 g; e 1% KOH, para 100 g de TG = 1,55 g.

Tabela 16. Condições reacionais, índice de acidez e percentual de conversão de AGL após a esterificação(Etapa 2), utilizando metanol:AG (mol:mol) 60:1 e 10% (m/m) de H₂SO₄

Reação	Éster	IA _i (mg g ⁻¹)	IA _f (mg g ⁻¹)	Conversão* (%)
15	Soja	6,16	0,15	98
16	Mamona	12,67	0,41	97
17	M:S	11,66	0,24	98
24	Soja	9,34	1,09	88
28	Mamona	14,93	0,66	96
33	M:S	12,14	0,22	98
18	Soja	7,43	0,24	97
19	Mamona	15,46	1,04	94
20	M:S	16,05	1,06	93
21	Soja	2,6	1,21	54
22	Mamona	10,02	2,4	76,
23	M:S	16,47	1,12	93

* Conversão= 100 x (IA_i – IA_f) / IA_i

O efeito da variação da concentração de NaOH sobre o rendimento das reação não foi muito relevante, ficando próximo em todos os testes aos valores teóricos de rendimento. Porém as melhores conversões (>95%) e menores índices de acidez foram obtidos utilizando 1% (m/m) de catalisador. No entanto, utilizando 1,2% (m/m) de NaOH a conversão para as reações contendo óleo de mamona foram menores, < 93%, ou seja, o excesso de catalisador favoreceu a reação de saponificação, reação que

ocorre simultaneamente à transesterificação; a separação das fases éster/glicerol durante a decantação não foi imediata, e durante as lavagens a formação de emulsão com maior facilidade foi observada.⁶⁴ Para as reações catalisadas com 1% (m/m) de KOH não foram obtidos rendimentos relevantes quando comparados as reações catalisadas com 1% em peso de NaOH. Porém, as melhores conversões e menores IA foram obtidos nas reações com 1% (m/m) de NaOH.

Foram coletadas amostras das reações que apresentaram menores índices de acidez para análise dos teores de glicerol livre e total, mono-, di-, e triglicerídeos. Por se tratar dos principais parâmetros de qualidade do biodiesel, pois são indicativos da eficiência dos processos de transesterificação e purificação do biodiesel. Os teores de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos das amostras analisadas estão apresentados na Tabela 28 no item 5.6.6 deste trabalho.

Na busca por obter maior conversão dos intermediários oriundos do processo de produção em ésteres foi estudado o aumento do tempo de transesterificação para 1,5 h, a determinação do tempo reacional foi acompanhada pela análise da conversão aparente dos TG utilizando CCD, Figura 9.

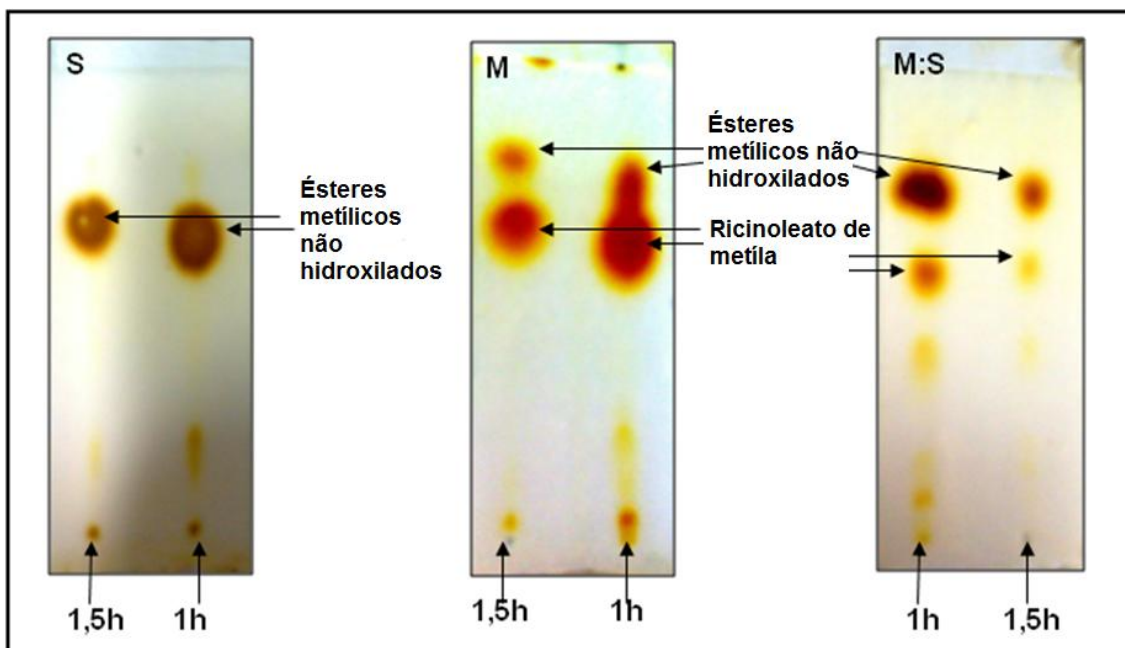


Figura 9. Placas cromatográficas das reações de transesterificação alcalina com metanol, $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1% de NaOH. Comparando 1 h e 1,5 h de reação. S: éster metílico de soja; M: éster metílico de mamona; e M:S: éster metílico da mistura mamona e soja

De acordo com a conversão aparente determinada por CCD, Figura 9, o tempo necessário para a reação de transesterificação foi de 1,5 h sendo visível nas placas cromatográficas a melhor conversão em relação ao tempo de 1 h. Assim o tempo de 1,5 h foi estabelecido como tempo de reação para a transesterificação dos óleos de soja, mamona e da mistura mamona e soja 30:70. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 17, 18 e 19.

Tabela 17. Condições reacionais, rendimentos e acidez após 1,5 horas de transesterificação alcalina e adição de H₂SO₄ (Etapa 1) usando metanol: TG (mol: mol) 6:1 e 1% (m/m) de NaOH como catalisador.

Reação	Óleo	Rendimento em massa (g)			IA (mg g ⁻¹)
		Biodiesel	Glicerol	Sal	
24	Soja	97	10,4	1,4	9,34
25	Mamona	106	6,4	1,6	12,51
26	M:S	101,6	10,3	1,6	10,9
27	Soja	111,5	10,5	1,5	10,37
28	Mamona	100,6	7,4	1,9	14,93
29	M:S	98,1	9,5	1,5	12,11
30	Soja	99,6	11	1,5	3,5
31	Mamona	100,5	7,3	1,8	14,42
32	M:S	102,3	11,1	1,6	11,47
33	M:S	99,3	10,1	1,9	12,14
34	M:S	99,5	14	1,4	16,79
Massa Teórica		*	**	1,78	---

*Éster metílico: soja = 100,6g, mamona = 101,4g, mistura = 100,5g. **Glicerol: soja = 9,75g, mamona = 9,96g e M:S = 9,78g.

As reações foram realizadas em triplicata para o óleo de soja e o de mamona, e em quintuplicata para a mistura dos óleos mamona e soja (30:70) visando monitorar no decorrer do trabalho se as reações mantinham o mesmo comportamento. Na Tabela 18, temos o rendimento médio e desvios das reações para cada óleo e mistura.

Tabela 18. Rendimento médio, teórico e obtido, e desvio padrão do rendimento médio obtido para o biodiesel metílico de soja, mamona e da mistura mamona e soja (30:70)

Biodiesel	Rend. médio teórico (g)	*Rend. médio obtido (g)	Desvio Padrão (g)
Soja	100,6	102,7	6,3
Mamona	101,4	102,3	2,6
M:S	100,5	100,2	1,6

* n= 3

Pode-se observar que a média mais próxima do rendimento teórico e com menor desvio padrão foi para o biodiesel metílico da mistura mamona e soja 30:70: 100,2 g \pm 1,6 g, confirmando o bom desempenho do processo aplicado principalmente ao biodiesel de mistura. No entanto, os resultados de rendimento e desvio padrão para o biodiesel metílico de soja e para o de mamona são considerados satisfatórios.

Tabela 19. Condições reacionais, índice de acidez e percentual de conversão de AGL após a esterificação (1,5h de transesterificação) (Etapa 2) usando metanol:AG (mol:mol) 60:1, e 10% (m/m) de H₂SO₄ como catalisador

Reação	Éster	IA _i (mg g ⁻¹)	IA _f (mg g ⁻¹)	Conversão* (%)
24	Soja	9,34	1,09	88
25	Mamona	12,51	1,75	86
26	M:S	10,9	0,84	92
27	Soja	10,37	0,08	99
28	Mamona	14,93	0,66	96
29	M:S	12,11	0,3	98
30	Soja	3,5	0,8	77
31	Mamona	14,42	0,59	96
32	M:S	11,47	0,84	93
33	M:S	12,14	0,22	98
34	M:S	16,79	0,46	97

*Conversão= 100 x (IA_i - IA_f) / IA_i

O tempo de 1,5 h de transesterificação não acarretou em melhoras significativas no que se referem a rendimentos, conversões de ácidos graxos livres em ésteres e diminuição do índice de acidez final se comparado ao tempo de uma hora de transesterificação. Porém, com uma hora e meia de transesterificação foi visível a maior conversão aparente dos intermediários da reação, tornando possível quantificar os monoglicerídeos no biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70). Os teores de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos das amostras analisadas estão apresentados na Tabela 29 no item 5.6.6 deste trabalho.

5.2. Determinação do teor de ésteres

Foi realizada a determinação do teor de ésteres da amostra M:S (29), biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70), de acordo com a norma europeia EN 14103.³⁰ O preparo das soluções analíticas e de amostra, as condições cromatográficas e os cálculos para obtenção do resultado estão descritos nos itens 4.6.6.2, 4.6.8.2 e 4.6.13 respectivamente, neste trabalho. O teor de ésteres determinado foi de 99,75%, ou seja, encontra-se de acordo com o mínimo exigido pela ANP que é de 96,5% (m/m).

5.3. Determinação do perfil graxo do biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70)

O biodiesel obtido da mistura mamona e soja (30:70) foi determinado como descrito nos itens 4.6.5, 4.6.6.3, 4.6.8.2 e 4.6.13 deste trabalho. Os ácidos graxos foram identificados com base nos tempos de retenção dos padrões injetados no GC-FID, e quantificados pelo método de normalização das áreas. Os resultados estão apresentados na Tabela 20 e Figura 10, respectivamente.

Tabela 20. Composição de ácidos graxos da mistura mamona e soja (30:70)

t_R (min)	Ácido Graxo	Composição (%)
2,9	Ácido Palmítico C16:0	8,6
4,6	Ácido Esteárico C18:0	2,6
4,9	Ácido Oléico C18:1	21,1
5,5	Ácido Linoléico C18:2	41,2
6,6	Ácido Linolênico C18:3	4,1
24,8	Ácido Ricinoléico C18:1-OH(12)	21,9

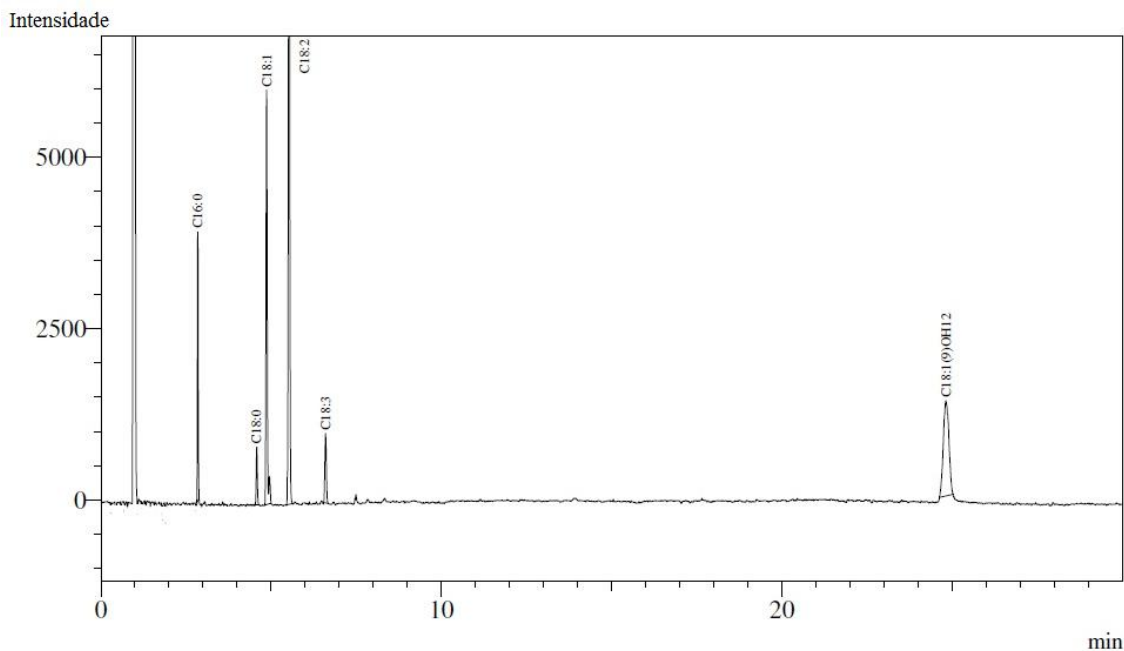


Figura 10. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos da mistura de óleos de mamona e soja (30:70)

5.4. Otimização da reação de derivatização com MSTFA para biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70)

Os métodos de referência ASTM D 6584 e EN 14105 são indicados para análise de mono-, di-, triglicerídeos, glicerol livre e total em ésteres derivados de óleo de colza e ésteres de composição química similar a este. Empregam como preparo de amostra a reação de silição do biodiesel para melhorar a resolução dos picos, proporcionar baixos limites de detecção além da elevada melhora na robustez do procedimento. Tornando os compostos de interesse mais voláteis e termicamente estáveis para determinação do teor de mono-, di-, triglicerídeos, glicerol livre e total simultaneamente.^{57, 58}

Entretanto, este método não tem sido aplicado para análise de biodiesel proveniente de óleo de mamona devido à composição química do biodiesel de mamona se diferenciar das oleaginosas convencionais pela presença de uma hidroxila ligada ao carbono 12 da cadeia graxa do ricinoleato, principal constituinte do biodiesel de mamona. Neste caso, os hidrogênios ácidos a mais advindos da hidroxila do ricinoleato podem consumir o reagente derivatizante

utilizado no método sendo necessário um excesso deste para garantir a derivatização dos mono-, di-, triglicerídeos e glicerol presentes na amostra. Há portanto, a necessidade de substituir os hidrogênios ácidos a mais advindos do ricinoleato, da monoricinoleína, da diricinoleína e da triricinoleína, além dos hidrogênios ácidos dos diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e do padrão interno (S)-(-)-1,2,4-butanotriol pelo grupo trimetilsilil, $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$, do agente sililante MSTFA (Figura 11).

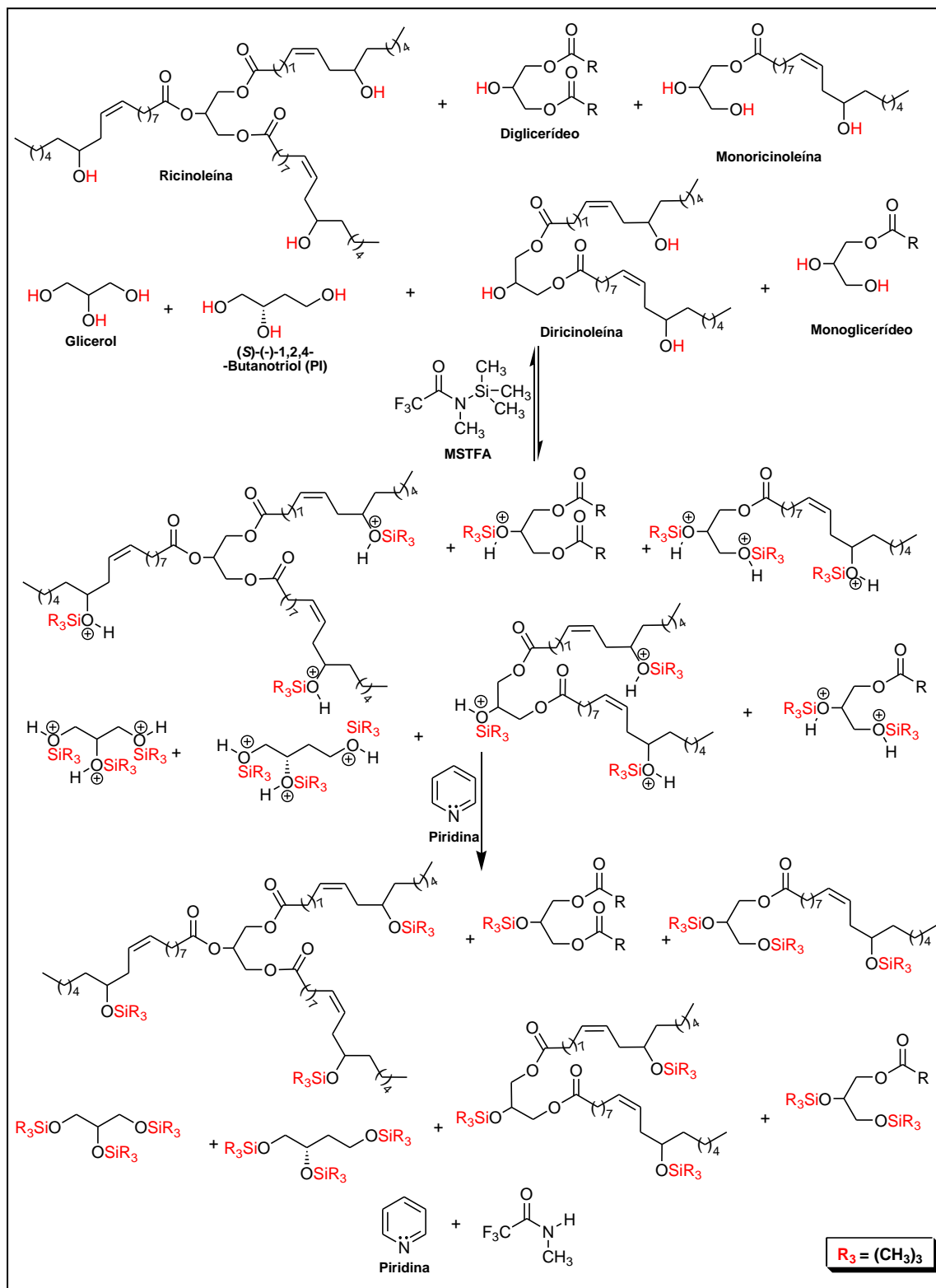


Figura 11. Representação da reação de silação

Em trabalho anterior de Dias e colaboradores¹⁴ foi estudado o emprego

dos métodos ASTM D 6584 e EN 14105 para o biodiesel etílico de mamona, uma vez que estes possibilitam a determinação simultânea dos teores de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos. Ambos os métodos empregam a reação de derivatização com 100 μL de MSTFA para sililar os grupos OH contidos na amostra. No estudo foram testados volumes maiores que 100 μL de MSTFA, e concluiu-se que 250 μL de MSTFA para a derivatização de 0,1 g de biodiesel etílico de mamona foi o volume ideal.

No caso deste trabalho, se faz necessário o estudo do volume de derivatizante para a reação de sililação dos ésteres metílicos da mistura mamona e soja (30:70) visando à busca contínua por aperfeiçoamento dos métodos (ASTM D 6584 e EN 14105) para que possam ser aplicados a uma maior diversidade de biodiesel e blendas com mamona e outras oleaginosas.

No estudo da reação de sililação foram feitos seis ensaios com 0,1 g de biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) e adicionado os seguintes volumes de MSTFA: 100, 120, 140, 160, 180 e 250 μL . Também foi derivatizada com 100 μL de MSTFA uma amostra de 0,1 g de biodiesel metílico de soja, para qual o método ASTM D 6584 é indicado, para ser usada como referência.

O teste de múltipla comparação de Tukey indicou como ideal as reações derivatizadas com os volumes entre 120 e 160 μL de MSTFA (Figura 12).

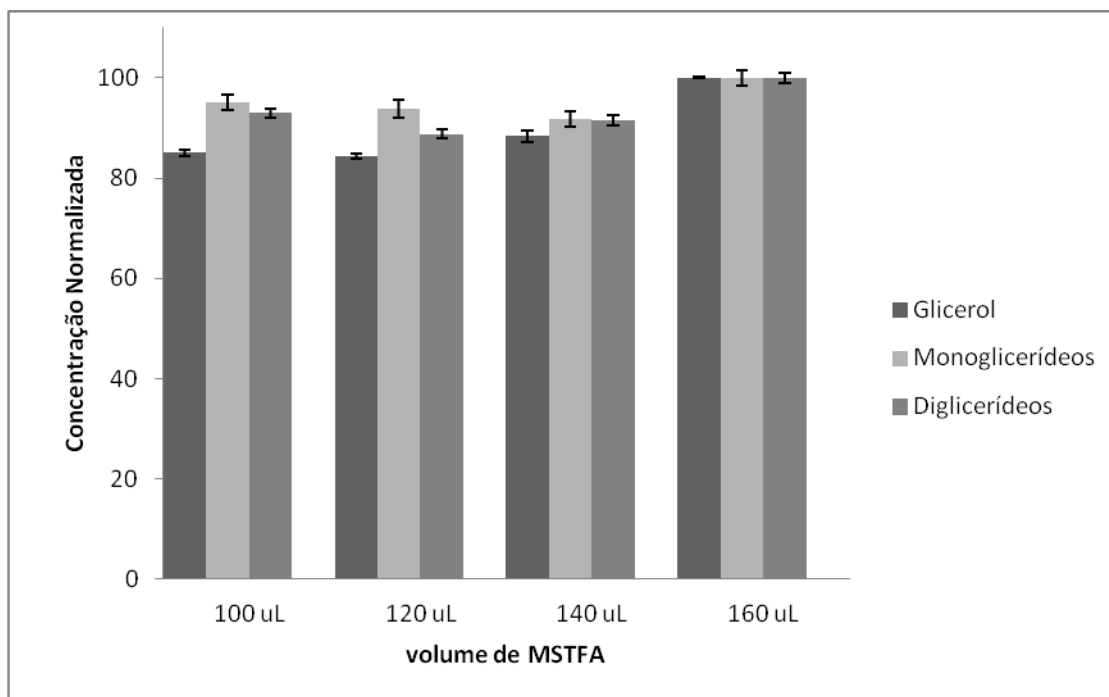


Figura 12. Comparação entre diferentes volumes de MSTFA na reação de derivatização (n= 9)

Visando uma margem de segurança, ao considerar que é desconhecido o teor desses contaminantes nas amostras, é usado um excesso de MSTFA. Por esse motivo foi escolhido como volume ótimo para a reação de sililação do biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) o volume de 160 μ L.

Um indicativo da reação completa de sililação foi a altura do pico do padrão interno (S)-(-)-1,2,4-butanotriol, indicador sensível de reação incompleta de sililação segundo estudo utilizado como base para elaboração dos métodos de referência, o qual afirma que quando o volume de derivatizante é insuficiente, as três hidroxilas desse padrão interno não sofrem sililação apresentando redução da área e altura de seu pico.³⁸ Isto foi observado, Figura 13, ao comparar o pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol de uma amostra de biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) derivatizada com 100 μ L de MSTFA com o pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol da amostra de biodiesel metílico de soja derivatizada com 100 μ L de MSTFA (amostra de referência).

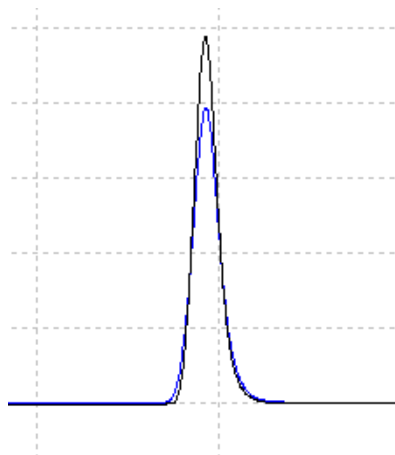


Figura 13. Em preto, pico do (S)-(-)-1,2,4-butanetriol do biodiesel de soja (amostra de referência) e em azul o pico (S)-(-)-1,2,4-butanetriol do biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) derivatizado com 100 μ L de MSTFA

Entretanto, quando se compara o pico do (S)-(-)-1,2,4-butanetriol da amostra de biodiesel metílico de soja derivatizada com 100 μ L de MSTFA (amostra de referência) com o pico do (S)-(-)-1,2,4-butanetriol da amostra de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) derivatizada com 160 μ L de MSTFA, Figura 14, os picos aparecem totalmente sobrepostos, isto é um indicativo que a reação de silição ocorreu de forma completa para o biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) nessas condições.

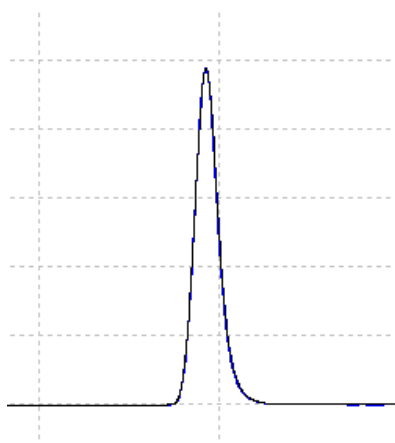


Figura 14. Em preto, pico do (S)-(-)-1,2,4-butanetriol do biodiesel de soja (amostra de referência) e em azul o pico (S)-(-)-1,2,4-butanetriol do biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) derivatizado com 160 μ L de MSTFA

De acordo com os parâmetros descritos no item 4.6.9 deste trabalho, foram identificados nos cromatogramas dos ensaios com 100 e 160 μ L de

MSTFA os compostos de interesse. Logo, foi realizada a comparação entre a razão das áreas (área composto/padrão interno), figuras 15 e 16, do glicerol, (S)-(-)-1,2,4-butanotriol (como é o padrão interno, considerou-se as áreas), monoricinoleína e diricinoleína dos respectivos ensaios.

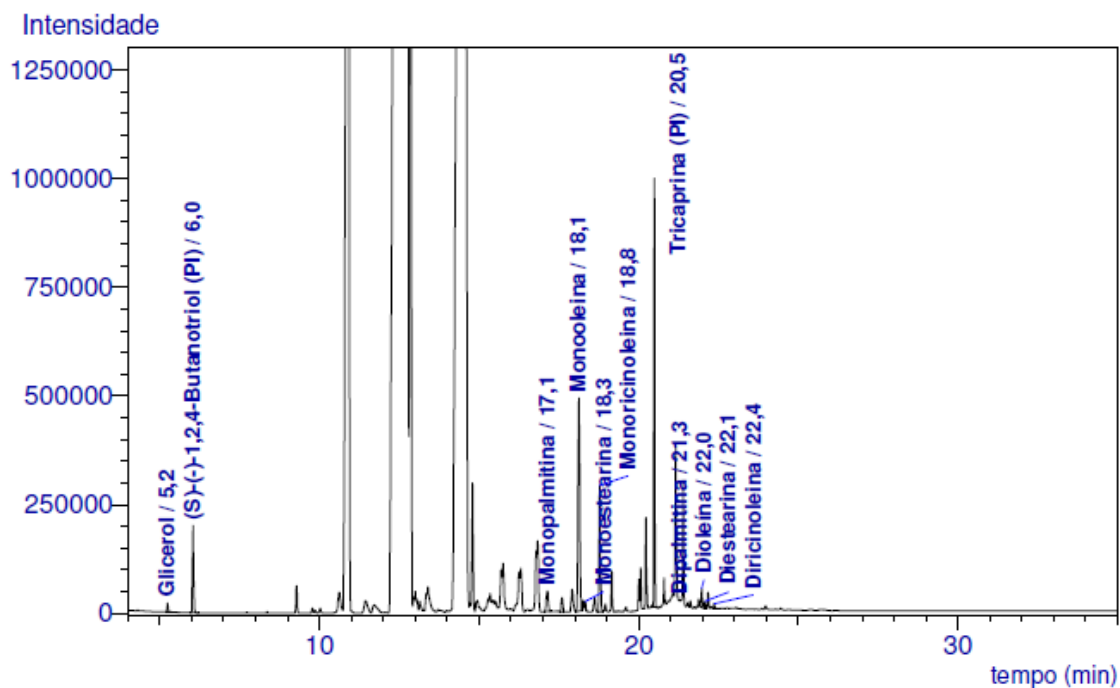


Figura 15. Perfil cromatográfico do biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) derivatizado com 100 μ L de MSTFA

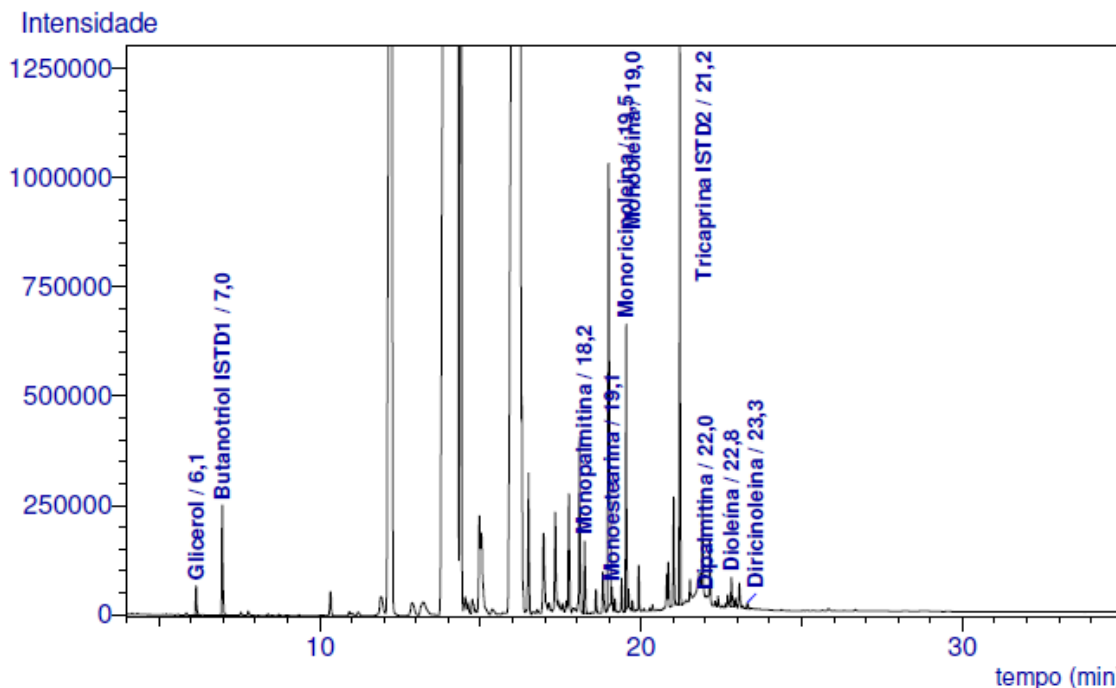


Figura 16. Perfil cromatográfico do biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) derivatizado com 160 μ L de MSTFA

Foi observado um aumento das áreas dos compostos presentes na amostra de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) derivatizada com 160 μ L de MSTFA. Este aumento variou entre 1,19 e 2,5 vezes como descrito na Tabela 21. Esta comparação também indica que a reação de siliilação com 160 μ L de derivatizante foi completa.

De acordo com o estudo realizado por Plank e Lobeer,³⁸ caso o volume de derivatizante fosse insuficiente, o pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol não seria totalmente derivatizado, a razão das áreas apresentada na Tabela 21 comprova que 100 μ L de MSTFA é insuficiente para derivatizar completamente o biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) pois pode-se observar um aumento de 2,5 vezes na área do pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol quando comparada a área do pico do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol do biodiesel derivatizado com 100 μ L e a área do pico do do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol do biodiesel derivatizado com 160 μ L de MSTFA.

Tabela 21. Relação entre as áreas do (S)-(-)-1,2,4-butanotriol e razão das áreas do GL, mono- e diricinoleína nas figuras 14 e 15.

Composto	Áreas 100 µL MSTFA	Áreas 160 µL MSTFA	Razão das áreas (100 µL /160 µL MSTFA)
Glicerol	0,1	0,25	2,5
(S)-(-)-1,2,4- Butanotriol	512613	611655	1,19
Monoricinoleína	0,42	0,55	1,31
Diricinoleína	0,013	0,017	1,31

Para ter ideia do excesso de derivatizante utilizado, cálculos estequiométricos foram realizados para se obter o volume de MSTFA consumido para derivatizar 100 µL do padrão interno (S)-(-)-1,2,4-butanotriol e 0,1 g de biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) considerando a amostra de biodiesel 100% pura. Também foi calculado o volume de MSTFA consumidos pelos contaminantes considerando que os mesmos estejam na concentração máxima permitida pelas normas.¹³ E ainda, foi calculado o consumo de MSTFA para sililar os contaminantes do biodiesel metílico de soja (referência). Estes cálculos estão apresentados no ANEXO A.

Somando os volumes de MSTFA consumidos para derivatizar o biodiesel de mistura 100% puro (17,8 µL), o padrão interno (S)-(-)-1,2,4-butanotriol (0,525 µL) e os contaminantes (1,23 µL) mostrados na Tabela 22, o consumo total de MSTFA para derivatizar uma amostra de 0,1 g de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) considerando que a concentração dos contaminantes esteja no limite aceitável é de aproximadamente 20 µL de MSTFA. Comparado ao volume de MSTFA correspondente as normas, 100 µL, este valor corresponde a um excesso de cinco vezes o volume consumido.

O consumo de MSTFA para os contaminantes do biodiesel metílico de soja (biodiesel de referência), apresentados na Tabela 23, somados ao volume de MSTFA consumido para derivatizar o padrão interno (S)-(-)-1,2,4-butanotriol (0,525 µL), uma vez que os ésteres e triglicerídeos derivados do óleo de soja

não possuem grupos hidroxilados e portanto, não sofrem derivatização, é de aproximadamente 1,63 μL . Logo, o volume de 100 μL de MSTFA corresponde a um excesso maior que sessenta vezes o volume consumido de MSTFA.

Tabela 22. Volume de MSTFA consumido pelos contaminantes presentes no biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70)

Contaminante	Conc. máx. % (m/m)*	Vol. consumido MSTFA (μL)
Glicerol	0,02	0,12
Monoglicerídeos	0,8	0,98
Diglicerídeos	0,2	0,09
Triglicerídeos	0,2	0,04
Total	---	1,23

*Limites de acordo com a EN 14214, as demais normas não estipulam valor máximo para glicerídeos.

Tabela 23. Volume de MSTFA consumido pelos contaminantes presentes no biodiesel metílico de soja

Contaminante	Conc. máx. % (m/m)*	Vol. consumido MSTFA (μL)
Glicerol	0,02	0,12
Monoglicerídeos	0,8	0,92
Diglicerídeos	0,2	0,06
Triglicerídeos	0,2	---
Total	---	1,1

*Limites de acordo com a EN 14214, as demais normas não estipulam valor máximo para glicerídeos.

Essas informações reforçam a necessidade do uso de um volume maior de agente derivatizante para sililar amostras contendo maior número de grupos hidroxilados, como no caso do biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) para o qual o valor escolhido como ótimo 160 μL de MSTFA representa um excesso de oito vezes o volume necessário para derivatizar 0,1 g de amostra.

5.5. Identificação e quantificação de mono-, di- e triglicerídeos

Estudos mostraram que quando se trabalha com coluna 5% fenil polidimetilsiloxano, indicada pelos métodos ASTM D 6584 e EN 14105, mono-, di- e triglicerídeos são separados de acordo com o número de carbonos, ou seja, quanto maior a cadeia carbônica maior será o tempo de retenção do composto na coluna. No caso de compostos com mesmo número de carbono eluem primeiro os insaturados seguido dos saturados e compostos insaturados com número de carbonos iguais coeluem mesmo diferindo no número de ligações duplas.³⁸

Como observado na Figura 17, sempre ocorre a coeluição da monooleína e monolinoleína, exemplos de compostos insaturados com mesmo número de carbonos.

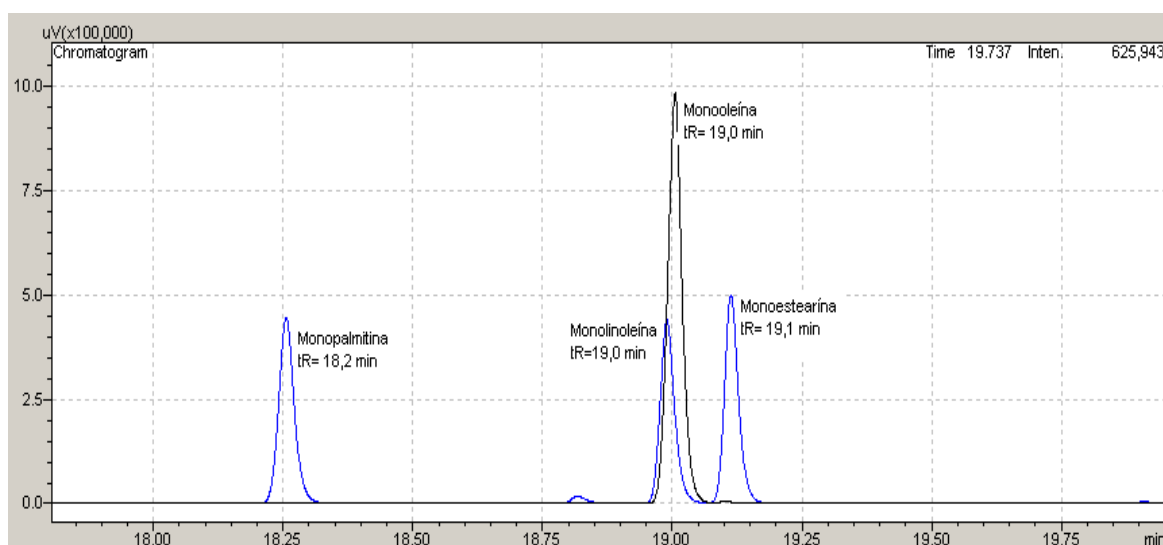


Figura 17. Perfil cromatográfico do 3º nível de concentração da monooleína (em preto) e da mistura dos padrões dos monoglicerídeos (em azul), sob as condições de análise do método ASTM D 6584

A figura 18 mostra a sobreposição dos padrões dos monoglicerídeos e das amostras de biodiesel metílico de soja, de mamona e da mistura mamona e soja (30:70) identificando os compostos por comparação com seus respectivos tempos de retenção para posterior quantificação.

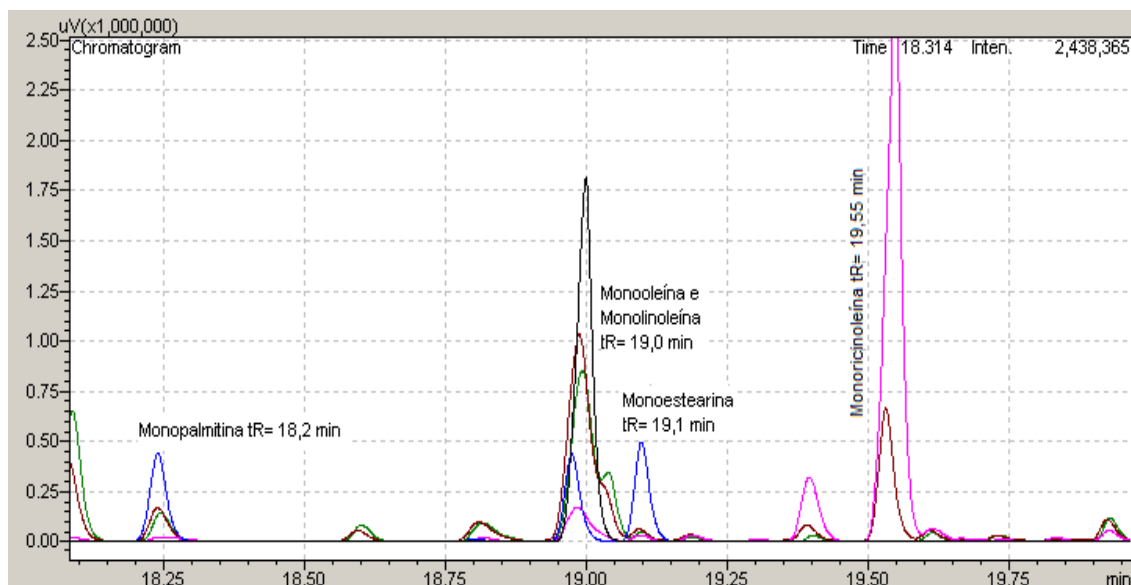


Figura 18. Perfil cromatográfico do 3º nível de concentração da monooleína (em preto) e da mistura dos padrões dos monoglicerídeos no 2º nível de concentração (em azul), das amostras de biodiesel metílico de soja (em verde), de mamona (em rosa) e da mistura mamona e soja (30:70) (em marrom) sob as condições de análise do método ASTM D 6584

A monoricinoleína, principal contaminante do biodiesel de mamona, foi identificada com $t_R = 19,4$ min com base nos procedimentos descritos no item 4.6.9 deste trabalho. Foram identificadas também a monopalmitina $t_R = 18,2$ min, monooleína $t_R = 19,0$ min, monolinoleína $t_R = 19,0$ min e monoestearina $t_R = 19,1$ min.

Devido a menor concentração de monoricinoleína no biodiesel da mistura mamona e soja, contendo 30% de ésteres derivados do óleo de mamona, a área dos picos referentes aos contaminantes do ricinoleato de metila foram menores, não seguindo o requisito (1) pico de área majoritária com relação aos demais monoglicerídeos. Porém, este deve eluir no mesmo tempo de retenção que a monoricinoleína presente no biodiesel metílico de mamona como mostrado quando sobrepostos os cromatogramas na Figura 18. Para identificação dos diglicerídeos se sobrepõem os respectivos cromatogramas: perfil cromatográfico do 3º nível de concentração da dioleína, da mistura dos padrões dipalmitina e diestearina no 2º nível de concentração

da curva analítica, das amostras de biodiesel metílico de soja, de mamona e da mistura mamona e soja (30:70) identificando os compostos por meio de comparação dos tempos de retenção para posterior quantificação (Figura 19). Para identificação da diricinoleína foi considerado os mesmos requisitos aplicados para identificação da monoricinoleína.

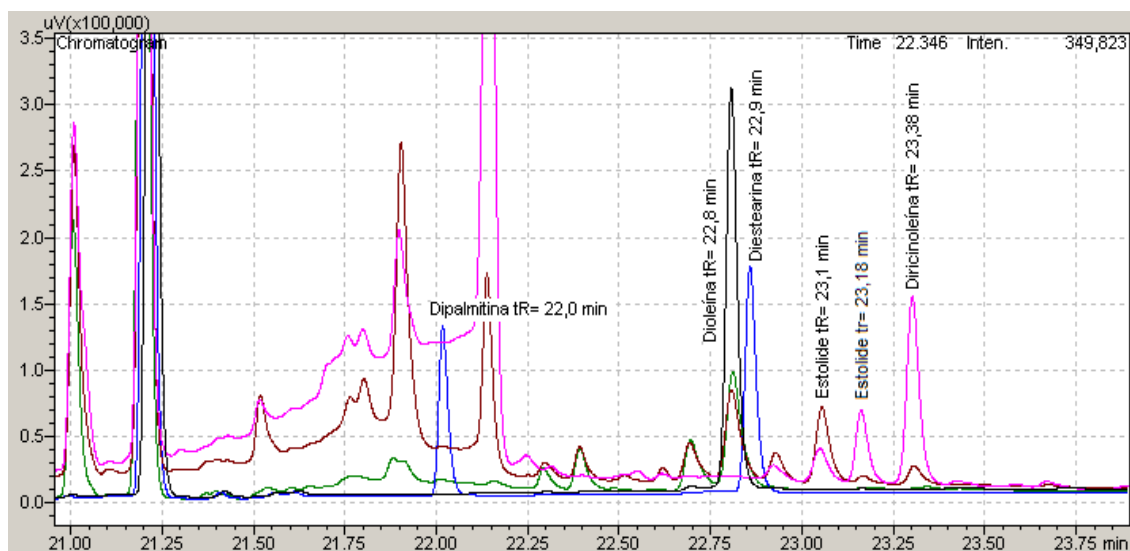


Figura 19. Perfil cromatográfico do 3º nível de concentração da dioleína (em preto) e da mistura dos padrões dos diglicerídeos no 2º nível de concentração (em azul), das amostras de biodiesel metílico de soja (em verde), de mamona (em rosa) e da mistura mamona e soja (30:70) (em marrom) sob as condições de análise do método ASTM D 6584

A dipalmitina foi identificada com $t_R = 22,0$ min, dioleína com $t_R = 22,8$ min, diestearina $t_R = 22,9$ min, diricinoleína $t_R = 23,38$ min. Cabe salientar, que visando melhorar a quantificação do método este trabalho propôs a identificação dos diglicerídeos a partir de dois padrões além da dioleína, a dipalmitina e diestearina em vez da quantificação por bandas.

Ainda na faixa dos diglicerídeos, foram desconsiderados dois picos eluídos entre os diglicerídeos nos tempos de retenção de 23,1 e 23,18 min respectivamente, por se tratarem provavelmente de dímeros formados no processo de produção do biodiesel. Estudo realizado no Centro de Pesquisa da Petrobras (CENPES) demonstrou que quando se trata de ésteres derivados do ácido ricinoleico, mesmo que misturado a outros derivados, ocorre durante a

reação de transesterificação a dimerização do ricinoleato com outros ésteres e ele mesmo. A hidroxila do ricinoleato, na presença de catalisador básico, reage com a carboxila dos ésteres formando os estolides.⁶⁵

Na Figura 20 é mostrada a sobreposição do perfil cromatográfico no 5º nível de concentração da trioleína, amostras de biodiesel metílico de soja, de mamona e da mistura mamona e soja (30:70). Neste caso, para os triglicerídeos foi estabelecida a banda de tempo de retenção de 31 a 35 min em virtude da inexistência do padrão analítico da triricinoleína, e considerou-se também que a mesma elui em média 2 minutos após a trioleína, $t_R = 32,1$ min. No entanto, mesmo com tempo de corrida cromatográfica de 36,81 min, aumentamos de 10 para 15 minutos o tempo de permanência em 380 °C, mesmo tempo adotado por Dias e colaboradores¹⁴ para eluir a triricinoleína de amostras de biodiesel etílico de mamona. Em nenhuma das amostras produzidas e analisadas no decorrer deste trabalho foi detectada a presença de quaisquer triglicerídeos não reagidos, confirmando a eficácia do processo de síntese empregado para produção dos ésteres metílicos de soja, mamona e da mistura mamona e soja (30:70).

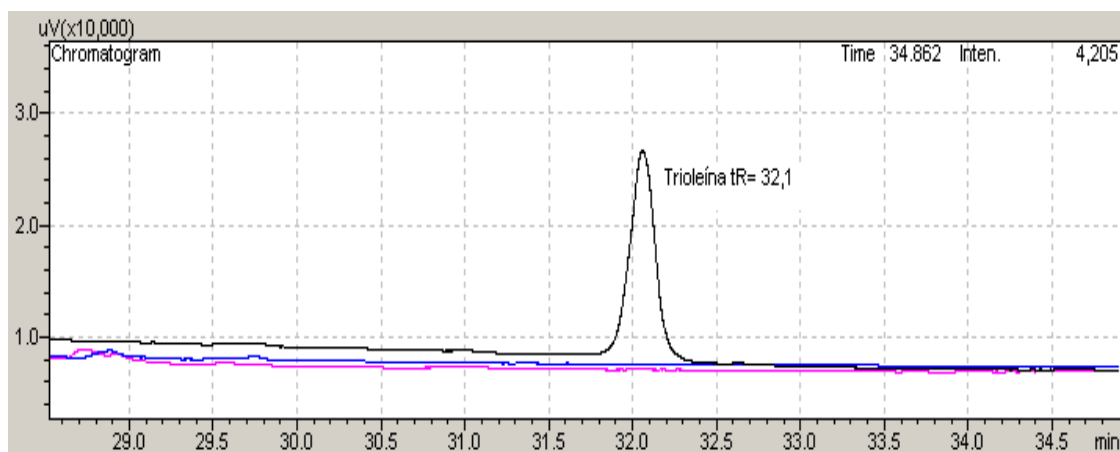


Figura 20. Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da trioleína (em preto), biodiesel metílico de mamona (em azul) e da mistura mamona e soja (30:70) (em rosa) sob as condições de análise do método ASTM D 6584

5.6. Validação do método

5.6.1. Curva analítica e linearidade

Segundo recomendação do INMETRO um valor de coeficiente de determinação aceitável deve ser maior que 0,90.⁵³ O método apresentou boa linearidade uma vez que o coeficiente de determinação (r^2) para todos os compostos foi $r^2 > 0,997$. Os resultados podem ser observados na Tabela 24 e na Figura 21. Quanto mais próximo de 1 for o coeficiente de Pearson (r) ou de determinação (r^2) menor será a dispersão dos pontos experimentais e a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

Tabela 24. Resultados de linearidade e curva analítica de cada composto no método considerando os padrões internos

Composto	Faixa linear % (m/m)	Equação da reta	r^2
Glicerol	0,005 – 0,05	$y = 1,0982x + 0,0018$	0,9981
Monooleína	0,1 – 1,0	$y = 1,3369x + 0,0134$	0,9975
Dioleína	0,05 – 0,5	$y = 0,5679x + 0,0366$	0,9995
Trioleína	0,05 – 0,5	$y = 0,0989x + 0,0005$	0,9982

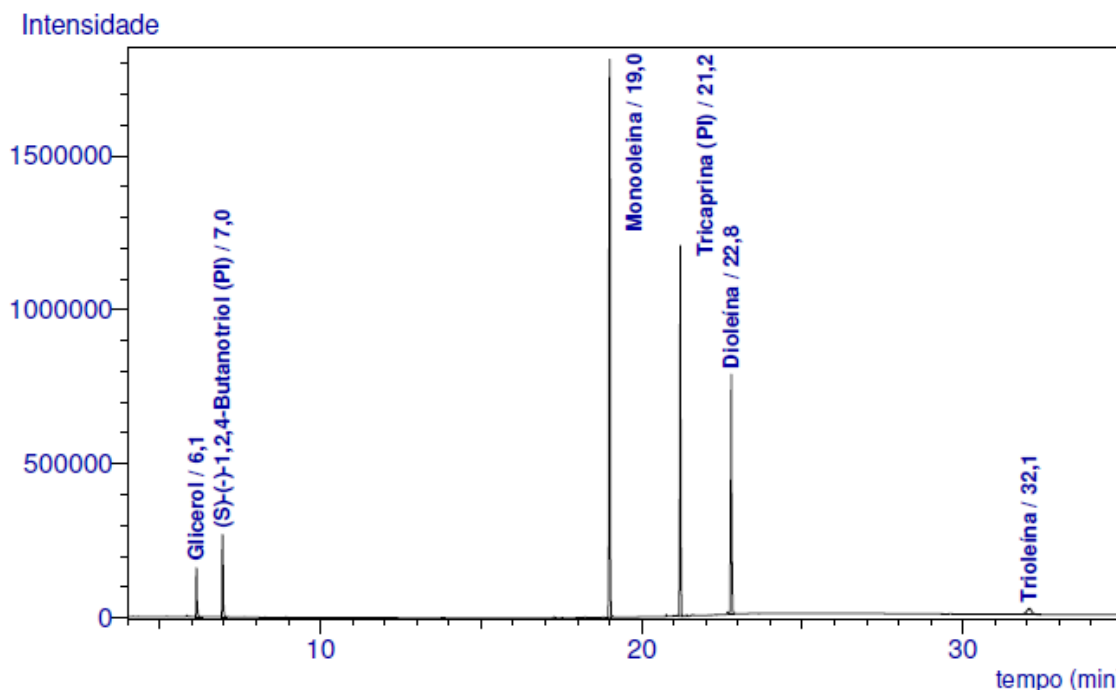


Figura 21. Perfil cromatográfico do 5º nível de concentração da mistura dos padrões analíticos sob as condições de análise do método ASTM D 6584

5.6.2. Exatidão

Os valores de exatidão foram calculados pelo método de adição de padrão para glicerol, monooleína e dioleína (Tabela 25) e variaram entre 70 e 141% para a repetitividade e entre 73 e 108% para a precisão intermediária. No caso da trioleína, a exatidão foi realizada através de ensaios de recuperação devido sua ausência na matriz estudada (Tabela 26) e os valores ficaram entre 89 e 109%. Os valores de exatidão para a matriz biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) foram satisfatórios.

5.6.3. Precisão

Foram avaliados a precisão do método em termos de repetitividade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) e precisão instrumental (RSD_i).

Os resultados de (RSD_r) e (RSD_{pi}) estão apresentados nas Tabelas 25 e 26, e os resultados de (RSD_i) na Tabela 27.

Tabela 25. Exatidão (%) e RSD (%) do método para os compostos no biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) em diferentes níveis

Composto	Nível de fortificação (% m/m)	Repetitividade		Precisão intermediária	
		Exatidão (%)	RSD (%)	Exatidão (%)	RSD (%)
Glicerol	0,005	93	3	73	3
	0,025	96	5	96	1
	0,05	101	1	95	4
Monooleína	0,1	141	2	90	1
	0,5	110	1	106	1
	1	104	4	108	1
Dioleína	0,05	70	3	98	1
	0,2	80	2	91	2
	0,5	88	1	102	1

Tabela 26. Recuperação (%) e RSD (%) do método para a trioleína no biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) em diferentes níveis

Composto	Nível de fortificação (% m/m)	Repetitividade		Precisão intermediária	
		R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
	0,05	109	10	104	6
Trioleína	0,2	89	2	89	5
	0,5	97	3	98	3

A (RSD_i) foi avaliada para cada composto em todos os níveis de concentração na curva analítica (Tabela 27) e foram obtidos valores de $RSD_i < 20\%$. Para o método, os resultados de repetitividade e de precisão intermediária variaram entre 1 e 5% para glicerol, monooleína e dioleína. Para a trioleína os valores de repetitividade variaram entre 2 e 10% e de precisão intermediária variaram entre 3 e 6%. Considerando a complexidade da matriz, biodiesel, os valores para precisão do método e instrumento foram satisfatórios, com valores de $RSD < 20\%$ como recomendado pela literatura.⁶⁶

Tabela 27. Precisão instrumental (RSD_i) para os compostos nos níveis de concentração da curva analítica em % (m/m)

Composto	1° nível	RSD _i (%)	2° nível	RSD _i (%)	3° nível	RSD _i (%)	4° nível	RSD _i (%)	5° nível	RSD _i (%)
Glicerol	0,005	0,4	0,015	1	0,025	0,01	0,035	0,03	0,05	0,3
Monoleína	0,1	0,3	0,25	0,1	0,50	3	0,75	3	1	0,2
Dioleína	0,05	3	0,1	1	0,2	6	0,35	2	0,5	0,4
Trioleína	0,05	16	0,1	19	0,2	4	0,35	4	0,5	3

5.6.4. Robustez

O método provou ser robusto frente a variação da composição química da matriz,^{14,60,67} aplicando o mesmo método à biodiesel de diferentes composições químicas, tais como biodiesel metílico de soja, biodiesel metílico de mamona e biodiesel metílico da mistura mamona e soja (após otimização da reação de silição).

5.6.5. Efeito Matriz

A comparação das curvas analíticas no solvente e na matriz, além da aplicação da Equação 10 descrita no item 4.6.12.5 deste trabalho, foram utilizadas para a avaliação da ocorrência ou não do efeito matriz para cada composto no biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70).

Na Figura 22 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para o glicerol.

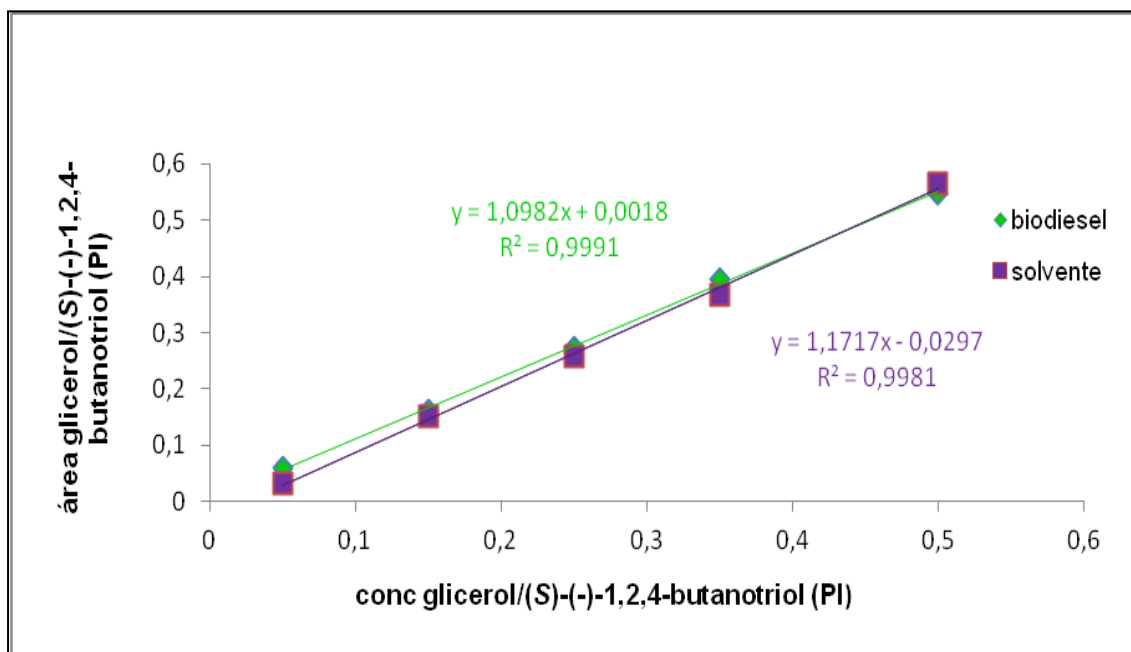


Figura 22. Curvas analíticas do glicerol no solvente e na matriz (biodiesel)

Na Figura 23 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para a monooleína.

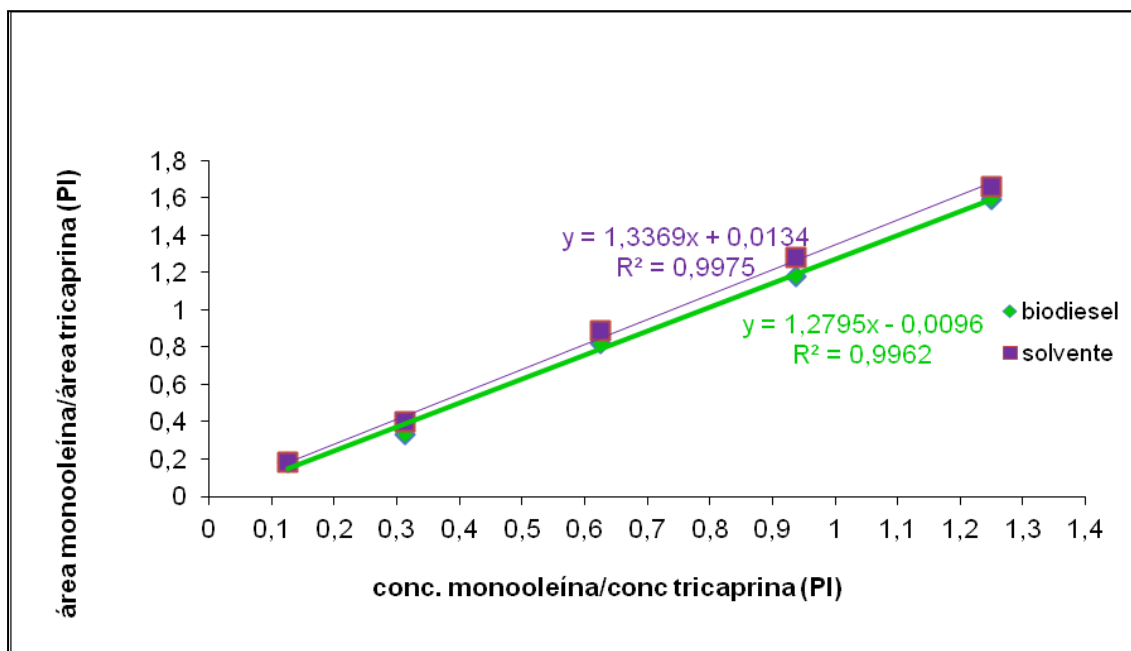


Figura 23. Curvas analíticas da monooleína no solvente e na matriz (biodiesel)

Na Figura 24 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na

matriz para a dioleína.

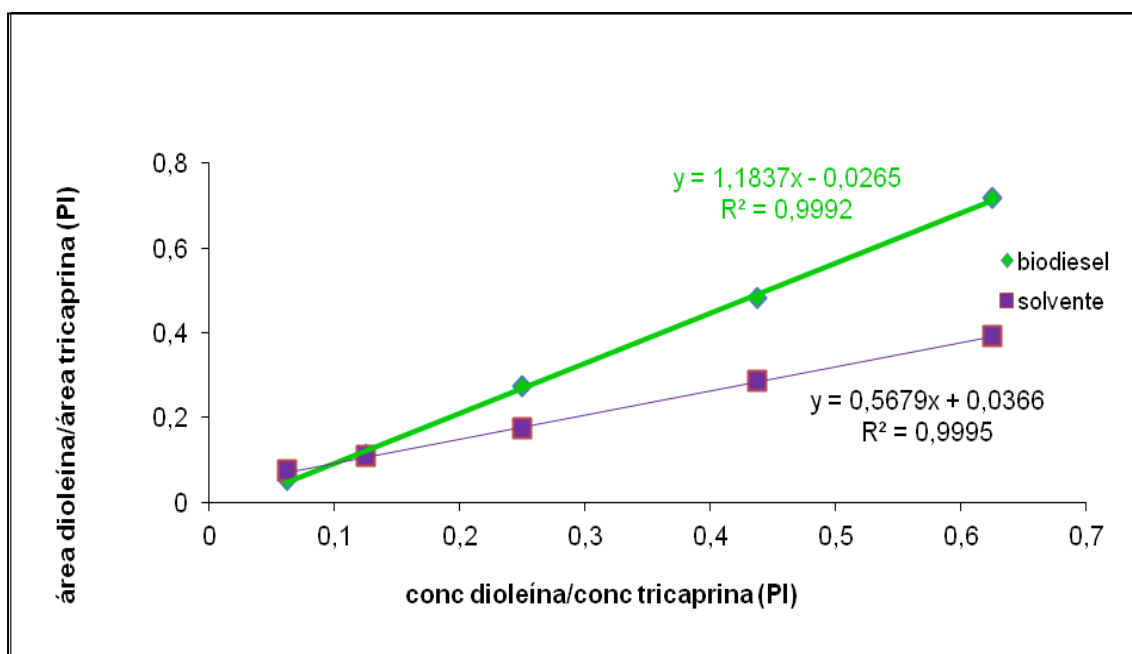


Figura 24. Curvas analíticas da dioleína no solvente e na matriz (biodiesel)

Na Figura 25 são apresentadas as curvas analíticas no solvente e na matriz para a trioleína.

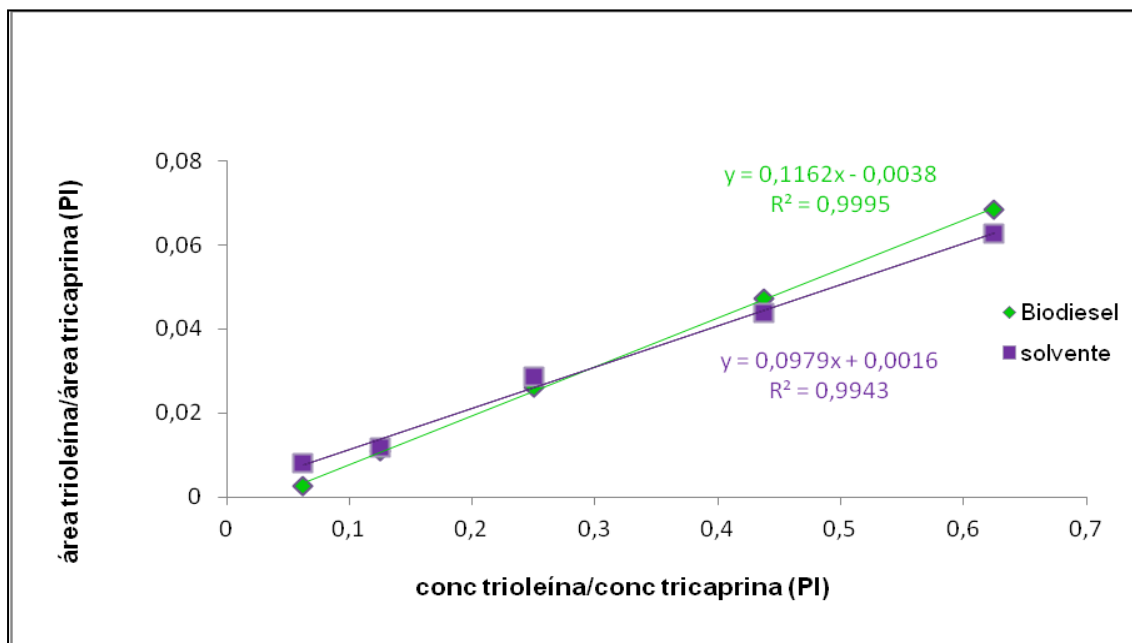


Figura 25. Curvas analíticas da trioleína no solvente e na matriz (biodiesel)

Como observado nas figuras 22, 23, 24 e 25 a comparação visual entre as curvas no solvente e na matriz mostrou a não ocorrência de efeito matriz significativo para o glicerol, monooleína e trioleína. No entanto, é visível a ocorrência de efeito matriz para a dioleína. Esses resultados podem ser confirmados na Figura 26.

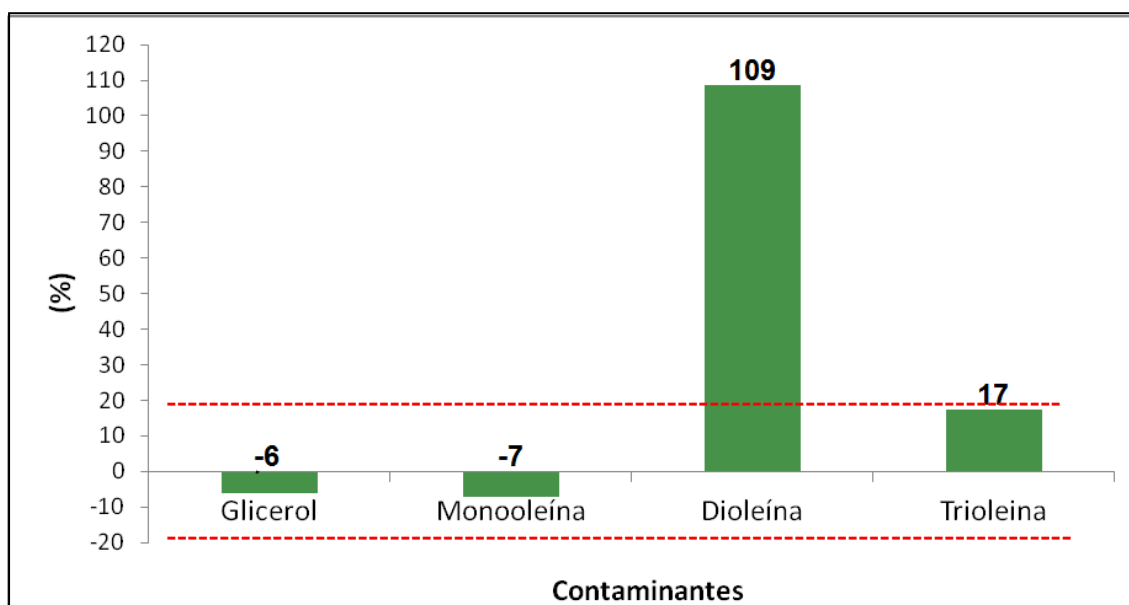


Figura 26. Efeito matriz (%) para os compostos calculados a partir das inclinações das curvas analíticas no solvente e na matriz (biodiesel)

Segundo estudos⁶⁸, o efeito matriz pode ser considerado significativo sobre os resultados analíticos quando obtido sinal de supressão/enriquecimento maior que $\pm 20\%$, a dioleína que apresentou efeito matriz de enriquecimento de 109%.

Estudos apontam a interação do insersor (*liner*) com a amostra como o principal causador do efeito matriz de enriquecimento. Nesse caso, a uma dada temperatura e tempo de residência suficiente os sítios ativos do *liner* absorvem ou induzem à degradação térmica. Pode-se dizer que há uma competição entre os componentes da matriz que ocupam os locais ativos do *liner* e apenas uma quantidade insignificante de substância a analisar é adsorvido, levando a um aumento significativo na resposta cromatográfica. Para superar esse tipo de efeito recomenda-se o preparo da curva analítica na matriz.^{69,70} Entretanto, o

método proposto usa injetor *on-column* com técnica de injeção *simple on-column*, ou seja, ocorre apenas um breve contato da amostra com o *liner*, não sendo atribuída a este o acentuado efeito matriz apresentado para a dioleína, o que torna desnecessário o preparo da curva analítica na matriz. Suspeita-se, portanto, que o efeito matriz na faixa de eluição dos diglicerídeos deva-se a presença de dímeros, estolides, que eluem muito próximo aos diglicerídeos, ocasionando os resultados acima da expectativa de processo ou efeito matriz positivo (enriquecimento do sinal cromatográfico da dioleína).⁴⁸ Uma possível solução seria testar as condições da EN 14105, por ter um tempo de corrida maior e condições mais brandas de temperatura, e buscar uma melhora na separação cromatográfica, assim, os estolides poderiam deixar de interferir na quantificação dos diglicerídeos. Outra medida para atenuar o efeito matriz em GC também é seguida pelo método, o uso de padrões internos com tempos de retenção próximos aos dos analitos no branco da matriz.

Porém, no caso do biodiesel, o uso de padrões no branco da matriz não pode ser seguido, pois a matriz biodiesel não é isenta de seus analitos de interesse. Uma outra solução seria o uso do método de adição padrão, mas cabe salientar que para análise de rotina, seria impraticável o preparo da curva analítica no biodiesel, pois ao considerar que o efeito matriz pode variar dependendo do caráter da matriz e da razão entre o analito e a matriz, para quantificação dos analitos em questão, seria necessário construir curvas na matriz para cada amostra, considerando a complexidade da matriz biodiesel, tornando a técnica muito laboriosa e de alto custo. Por isso o preparo de curvas analíticas no solvente com adição de padrão interno, que minimiza o efeito de matriz, e soluções padrões (monopalmitina, monooleína, monolinoleína, monoestearína, dipalmitina e diestearina) para auxiliar numa quantificação mais exata e precisa faz-se necessário no caso do presente trabalho.

5.6.6. Aplicação do método para determinação simultânea de GL, GT e glicerídeos em biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70)

Este método analítico foi aplicado a amostras de biodiesel metílico de soja, mamona e da mistura mamona e soja (30:70) sintetizadas no decorrer deste trabalho para monitorar a adequação do processo desenvolvido no laboratório Kolbe para produção de FAEEs a partir de óleos vegetais hidroxilados à produção de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70), um dos objetivos do presente trabalho. A aplicação do método validado pode ser observada nas Tabelas 28 e 29.

Tabela 28. Concentrações (%m/m) para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos das reações com 1 h de transesterificação

Biodiesel (Amostra)	Glicerol livre	mono-	di-	tri-	Glicerol total
ANP*	0,020	anotar	anotar	anotar	0,25
Soja (2) ^a	<0,005	0,44	0,14	<0,05	0,14
Mamona (7) ^b	<0,005	>1	0,37	<0,05	0,62
M:S (11) ^c	<0,005	>1	0,18	<0,05	0,33
Soja (15) ^a	<0,005	0,57	0,06	<0,05	0,16
Mamona (16) ^b	<0,005	>1	0,19	<0,05	0,82
M:S (17) ^c	<0,005	>1	0,10	<0,05	0,54

*Resolução nº 14 ANP/maio 2012. ^a Éster metílico de soja.

^b Éster metílico de mamona. ^c Éster metílico da mistura mamona e soja (30:70).

Para todas as reações, com tempo de transesterificação de 1 h, não foi possível quantificar o percentual de glicerol livre e de triglicerídeos presentes nas amostras devido aos mesmos estarem abaixo dos seus respectivos limites de quantificação da curva analítica. Esses resultados confirmam a eficiência da

reação de transesterificação porque todo óleo (triglicerídeo) no processo foi convertido em ésteres, e da separação das fases (éster/glicerol). Porém o alto teor de monoglicerídeos, extrapolando o limite de quantificação da curva analítica, indica que a conversão de monoglicerídeos em ésteres não foi completa para as amostras de biodiesel metílico de mamona e da mistura mamona e soja (30:70). Devido este fato estudou-se o aumento do tempo da reação de transesterificação para 1,5h.

Como podem ser observados na Tabela 29, os resultados da determinação de mono-, di-, triglicerídeos, glicerol livre e total nas amostras com 1,5 h de reação de transesterificação, em especial das reações a partir da mistura mamona e soja (30:70) puderam ser quantificados, o que anteriormente não era possível de fazê-lo com precisão e exatidão porque o alto teor de monoglicerídeos nas amostras extrapolava o limite máximo da faixa linear da curva analítica.

Tabela 29. Concentrações (%m/m) para glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos com 1,5 h de transesterificação

Amostra	Glicerol livre	mono-	di-	tri-	Glicerol total
ANP*	0,020	anotar	anotar	anotar	0,25
Soja (24) ^a	<0,005	0,74	0,16	<0,05	0,22
Mamona (25) ^b	0,12	>1	0,36	<0,05	0,98
Mistura (26) ^c	<0,005	>1	0,14	<0,05	0,35
Mamona (28) ^b	<0,005	>1	0,21	<0,05	0,44
M:S (29) ^c	<0,005	0,97	0,11	<0,05	0,27
M:S (33) ^c	<0,005	0,83	0,10	<0,05	0,23
M:S (34) ^c	0,007	>1	0,24	<0,05	0,43

* Resolução n° 14 ANP/maio 2012. ^a Éster metílico de soja. ^b Éster metílico de mamona. ^c Éster metílico da mistura mamona e soja 30:70% (m/m)

Cabe ressaltar que, todas as amostras analisadas, exceto a Mamona **(25)**, apresentaram valores de GL dentro dos limites exigidos pela ANP. As amostras Soja **(2)**, Soja **(15)**, Soja **(24)** e M:S **(33)** apresentaram valores de GT dentro dos limites exigidos pela ANP, com destaque para a amostra M:S **(33)** que está dentro das especificações estabelecidas pela ANP referentes a índice de acidez e teor de mono-, di-, triglicerídeos, glicerol livre e total.

Nas Figuras 27, 28 e 29 são apresentados os cromatogramas de cada tipo de biodiesel estudado.

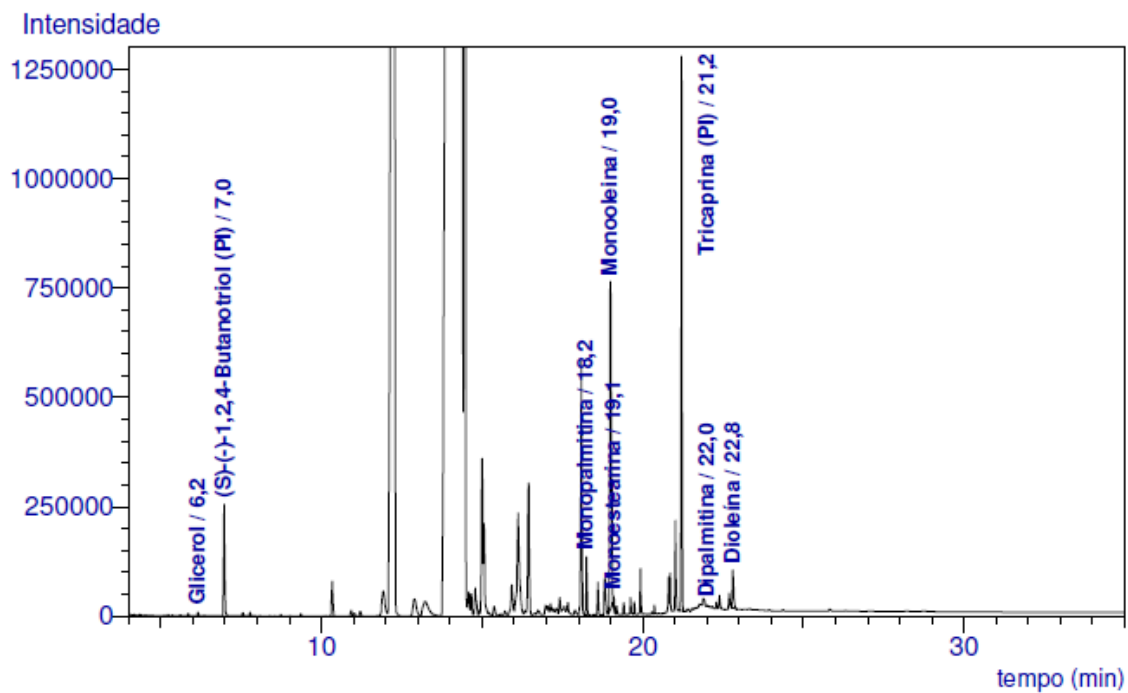


Figura 27. Perfil cromatográfico de uma amostra de biodiesel metílico de soja analisada

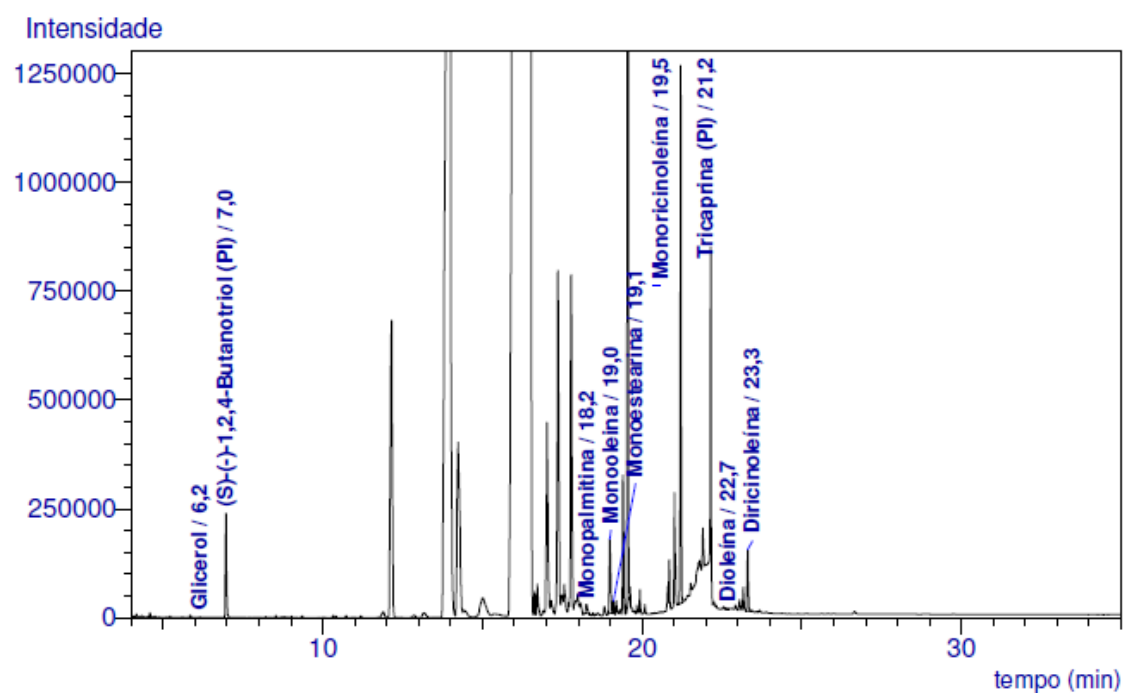


Figura 28. Perfil cromatográfico de uma amostra de biodiesel metílico de mamona analisada

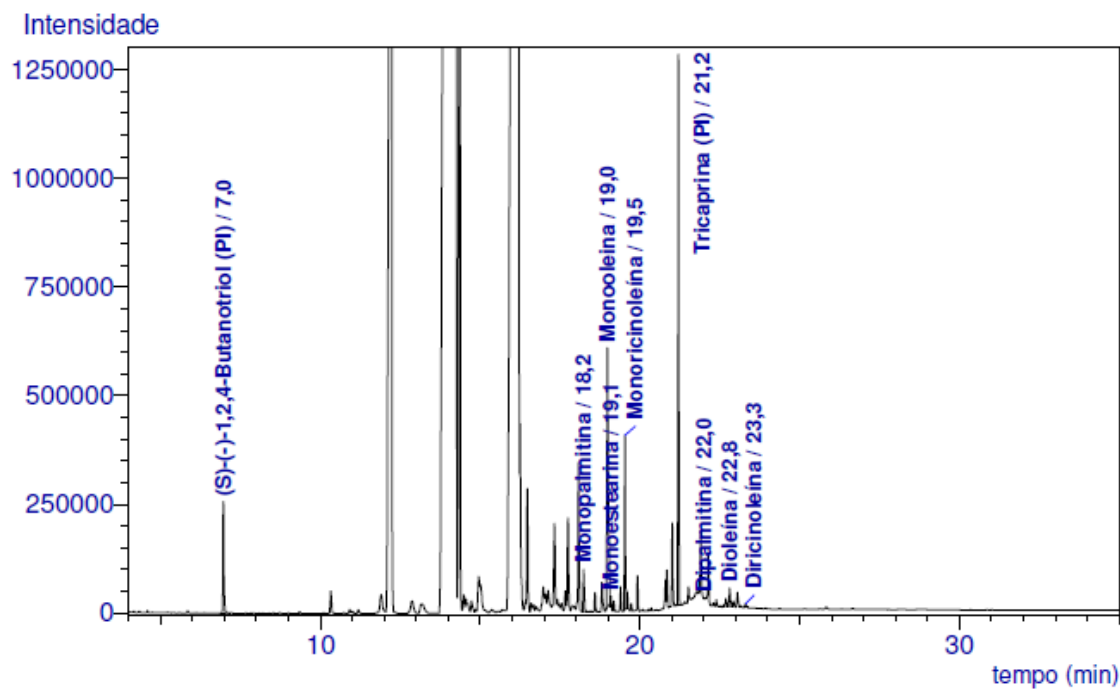


Figura 29. Perfil cromatográfico de uma amostra de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) analisada

6. CONCLUSÃO

A partir da adequação do processo de produção de biodiesel desenvolvido para FAEEs foi viável a produção de ésteres da mistura mamona e soja nas proporções 30% mamona e 70% soja dentro das especificações da ANP, utilizando como catalisador alcalino 1% de NaOH e 1,5 h de reação de transesterificação. Com tempo de 1,5 h de reação de transesterificação (etapa I) também foi possível diminuir os intermediários da reação, tornando possível quantificar os monoglicerídeos no biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70).

A reação de derivatização para o biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70) mostrou-se eficiente ao utilizar um volume de MSTFA de 160 μ L.

Foram obtidos resultados satisfatórios para os parâmetros de validação avaliados. O método apresentou curvas analíticas com boa linearidade, com r^2 maiores que 0,997, mostrando exatidão e precisão dentro das faixas preconizadas pela literatura que são de 70 a 120% com RSD<20%. O método analítico também se mostrou robusto frente à variação química das amostras.

O glicerol, monooleína e trioleína não apresentaram efeito matriz significativos, a dioleína apresentou efeito matriz alto. Ainda assim é preferível realizar a quantificação a partir das curvas analíticas no solvente.

Durante a aplicação do método, o mesmo mostrou-se adequado para as amostras de biodiesel metílico de soja, de mamona e da mistura mamona e soja (30:70) possibilitando a determinação simultânea de mono-, di-, triglicerídeos, glicerol livre e total em amostras de ésteres derivados de óleo de mamona.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver método por LC-DAD, por não ser necessário derivatizar a amostra de biodiesel, e comparar com o método apresentado neste trabalho;
- Realizar o mesmo estudo desenvolvido neste trabalho porém para biodiesel etílico de soja, mamona e da mistura mamona e soja (30:70);
- Sintetizar e isolar os estóides analisá-los por GC-MS para obter sua confirmação, e analisa-los nas condições do método apresentado neste trabalho para confirmar sua eluição na faixa dos diglicerídeos;
- Quando houver disponibilidade de padrões analíticos para monoricínoleína, 1,3-diricinoleína e triricinoleína realizar corridas cromatograficas nas condições do método validado neste trabalho visando a confirmação dos mesmos;
- Realizar estudo do efeito matriz empregando biodiesel destilado para construção da curva na matriz.

8. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos oriundos da síntese do biodiesel e das análises foram separados em frascos âmbar, rotulados e armazenados adequadamente aguardando procedimento a ser adotado pela instituição.

9.PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO

Moura, R. R.; Callegaro, F. J. P.; Granjão, V. F.; Dias, A. N.; Primel, E. G.; D'Oca, M. G. M. **Produção de biodiesel de misturas mamona:soja e determinação dos teores de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos.** In: SBQ Nacional - 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, SC, 2011.

Moura, R. R.; Dias, A. N.; Primel, E. G.; D'Oca, M. G. M. **Determinação de glicerídeos, glicerol livre e total em biodiesel de mamona e mistura com soja por GC-FID.** In: SBQ Nacional - 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, SC, 2011.

Moura, R. R.; Granjão, V. F.; Dias, A. N.; Caldas, S.S.; Primel, E. G.; D'Oca, M. G. M. **OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE GLICEROL LIVRE E TOTAL, MONO-, DI- E TRIGLICERÍDEOS EM BIODIESEL METÁLICO DE MISTURA MAMONA E SOJA POR GC-FID.** In: ENQA - 16º Encontro Nacional de Química Analítica, Campos do Jordão, SP, 2011.

Moura, R. R.; Granjão, V. F.; Dias, A. N.; Primel, E. G.; D'Oca, M. G. M. **VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE GLICEROL LIVRE E TOTAL, MONO-, DI- E TRIGLICERÍDEOS EM ÉSTERES METÁLICOS DA MISTURA MAMONA E SOJA (30:70) POR GC-FID.** In: COLACRO XIV - Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, Florianópolis, SC, 2012.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MEHER, L. C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2006**, 248–268.
2. FARIA, R. C. M.; REZENDE, M. J. C.; REZENDE, C. M.; PINTO A. C. Desenvolvimento e Validação de Metodologia de Análise de Misturas Biodiesel: Diesel Utilizando Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas, *Química Nova* **2007**, 30, 1900-1905.
3. MDA (Ministério do Desenvolvimento Agrário): **Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB)**. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <www.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/biodiesel/arquivos-2011/Biodiesel_Book_final_Low_Completo.pdf>. Acesso em: 22/09/2012.
4. Embrapa Clima Temperado. Documentos, 192: **Zoneamento agroclimático para mamona no Rio Grande do Sul**. Pelota, RS, 2007. Disponível em: <www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento_192.pdf>. Acesso em: 22/09/2012.
5. CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* **2007**, 25, 294-306.
6. SCHOLZ, V.; SILVA, J. N. Prospects and risks of the use of castor oil as a fuel. *Biomass & Bioenergy* **2008**, 32(2), 95–100.
7. D'OCA, M. G. M., HAERTEL, P. L.; MORAES, D. C.; CALLEGARO, F.J. P.; KURTZ, M. H. S.; PRIMEL, E. G.; CLEMENTIN, R. M.; MORÓN-VILLARREYES, J. A. Base/Acid-Catalyzed FAEE Production From Hydroxylated Vegetable Oils. *Fuel* **2011**, 90, 912-916.
8. GOODRUM JW, GELLER DP. Influence of fatty acid methyl esters from hydroxylated vegetable oils on diesel fuel lubricity, *Bioresource Technology* **2005**, 96, 851-855.
9. ABRAMOVAY, R. **Biocombustíveis: a energia da controvérsia**. São Paulo: Senac, 2009, 59- 97.
10. ALBUQUERQUE, M. C. G.; MACHADO, Y. L.; TORRES, A. E. B.; AZEVEDO D. C. S.; CAVALCANTE, Jr, C. L.; FIRMIANO, L.R.; PARENTE, Jr, E. J. S. Properties of biodiesel oils formulated using different biomass sources and their blends. *Renewable Energy* **2009**, 34, 857-859.

-
11. MITTELBACH, M., WÖRGETTER, M., PERNKOPF, J., JUNEK, H. Diesel fuel derived from vegetable oils, I: preparation and use of rapeseed-oil methyl esters. *Energy in Agriculture* **1983**, 2, 369-384.
 12. CRUZ, R. S.; LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova* **2009**, 32, 1596-1608.
 13. ANP. Resolução - RE nº 14, DE 11.5.2012 Disponível em: <<http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>> Acesso em: 28/06/2012.
 14. DIAS, A. N.; CERQUEIRA, M. B.; MOURA, R. R.; KURZ, M. H. S.; CLEMENTIN, R. M.; D'OCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G. Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography. *Fuel* **2012**, 94, 178-183.
 15. HOEKMAN, S. K.; BROCH, A.; CERICEROS, E.; NATARAJAN, M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2012**, 16, 143–169
 16. ABBASZAADEH, A.; GHOBADIAN, B.; OMIDKHAH, M. R.; NAJAFI, G. Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management* **2012**, 63, 138–148
 17. DEMIRBAS, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy* **2007**, 35, 4661–4670
 18. FANGRUI, M.; HANA, M. A. Biodiesel production: a review. *Bioresour Technology*, **1999**, 70, 1–15.
 19. DEMIRBAS, A. Biodiesel from waste cooking oil via base-catalytic and supercritical methanol transesterification. *Energy Convers Manage* 2009, 50, 923–927.
 20. FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2001**, 92, 405–416.
 21. SCHWAB, A. W.; BAGBY, M. O.; FREEDMAN, B. Preparation and Properties of Diesel Fuels from Vegetable Oils. *Fuel* **1987**, 66, 1372-1378.
 22. KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 1-2008.

-
23. MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* **2007**, 11, 1300–1311.
24. ANP. Biodiesel - Introdução. Atualizado em 28/05/2012. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=60468&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebusc=1344280031280>>. Acesso em: 02/08/2012.
25. DABDOUB, M.J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: Visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. *Química Nova* **2009**, 32, 776-792.
26. SCHNEIDER, R. C. D. S.; BALDISSARELLI, V. Z.; TROMBETTA, F.; MARTINELLI, M.; CARAMÃO, E. B. Optimization of gas chromatographic–mass spectrometric analysis for fatty acids in hydrogenated castor oil obtained by catalytic transfer hydrogenation. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 505, 223–226.
27. ANP. BOLETIM MENSAL DE BIODIESEL (JUN 2012). Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=61095&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebusc=1344279821344>>. Acesso em: 02/08/2012.
28. RAMEZANI, K.; ROWSHANZAMIR, S.; EIKANI, M. H. Castor oil transesterification reaction: A kinetic study and optimization of parameters. *Energy* **2010**, 35, 4142-4148.
29. CANOIRA, L.; GALEÁN, J. G.; ALCÁNTARA, R.; LAPUERTA, M.; CONTRERAS, R. G. Fatty acid methyl esters (FAMES) from castor oil: Production process assessment and synergistic effects in its properties. *Renewable Energy* **2010**, 35, 208-217.
30. BERMAN, P.; NIZRI, S.; WIESMAN, Z. Castor oil biodiesel and its blends as alternative fuel. *Biomass and Bioenergy* **2011**, 35, 2861-2866.
31. BARBOSA, D. C.; SERRA, T. M.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R. Biodiesel production by ethanolysis of mixed castor and soybean oils. *Fuel* **2010**, 3791-3794.
32. MITTELBACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: specifications and quality control of biodiesel. *Bioresource Technology* **1996**, 56, 7-11.
33. PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. . Environmental and food applications of LC–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. *Mass Spectrometry Reviews* **2004**, 23, 45–85.
34. SAARI, E.; PERÄMÄKI, P.; JALONEN, J. Effect of sample matrix on the determination of total petroleum hydrocarbons (TPH) in soil by gas chromatography–flame ionization detection. *Microchemical Journal* **2007**, 87, 113–118.

-
35. WELLS, R. J. Recent advances in non-silylation derivatization techniques for gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1999**, 843, 1-18.
36. LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993, 240 p.
37. Regis Technologies, Inc. Chromatography GC Derivatization Agents. Disponível em: < <http://www.registech.com/Library/gcderrev.pdf>>. Acesso em: 06/10/2012.
38. PLANK, C.; LORBEER, E. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1995**, 697, 461- 468
39. SCHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B. M.R.; WENNIG, R.; MILLET, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta* **2009**, 77, 1473-1482.
40. FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; KWOLEK, W. F. Thin layer chromatography/flame ionization analysis of transesterified vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society* **1984**, 61, 1215-1220.
41. MONTEIRO, M. R.; AMBROZINA, R. P.; LIÃO, L. M.; FERREIRA, A. G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta* **2008**, 77, 593-605.
42. FREEDMAN, B.; KWOLEK, W. F.; PRYDE, E. H. Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capillary gas chromatography. *Journal of the American Oil Chemist's Society* **1986**, 63, 1370-1375.
43. MITTELBAACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils, V [1]: Gas chromatographic determination of free glycerol in transesterified vegetable oils. *Chromatographia* **1993**, 37, 623-626.
44. HOLCAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER, J.; PROKES, B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by highperformance liquid chromatography with various detection methods. *Journal of Chromatography A* **1999**, 858, 13-31.
45. FOGLIA, T.A.; JONES, K.C.; NUNEZ, A.; PHILLIPS, J.G.; MITTELBAACH, M. Comparison of chromatographic methods for the determination of bound glycerol in biodiesel. *Chromatographia* **2004**, 60, 305-311.
46. ARZAMENDI, G.; ARGUIÑARENA, E.; CAMPO, I.; GANDÍA, L. M. Monitoring of biodiesel production: Simultaneous analysis of the

transesterification products using size-exclusion chromatography. *Chemical Engineering Journal* **2006**, 122, 31-40.

47. CATHARINO, R.R.; MILAGRE, H.M.S.; SARAIVA, S.A.; GARCIA, C.M.; SCHUCHARDT, U.; EBERLIN, M.N.; AUGUSTI, R.; PEREIRA, R.C.L.; GUIMARÃES, M.J.R.; DE SÁ, G.F.; CAIXEIRO, J.M.R.; DE SOUZA, V. Biodiesel Typification and Quality Control by Direct Infusion Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting. *Energy & Fuels* **2007**, 21, 3698-3701.

48. GONÇALVES FILHO, L. C.; MICK, G. A. Development and validation of a fast method for determination of a free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1154, 477-480.

49. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 3. ed. Campinas: Unicamp, 2010. 203-228 p.

50. VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. 6. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 462 p.

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

52. PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova* **2009**, 32, 1713-1716.

53. INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 03 - Brasília, DF, 2010.

54. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução RE nº 899, de 29/05/2003*. "**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**". ANVISA, Brasília, DF, 29 mai. 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 30/04/2012.

55. ZHANG, Y.; STANCIULESCU, M.; IKURA, M. Rapid transesterification of soybean oil with phase transfer catalysts. *Applied Catalysis A. General* **2009**, 366, 176 – 183.

56. ABNT NBR 14448 – Determinação do número de acidez pelo método de titulação potenciométrica. Disponível em: <<http://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=51031>> Acesso: 28/06/2012.

57. ASTM D 6584 - Método Padrão para Determinação de Monoglicerídeos Totais, Diglicerídeos Totais, Triglicéridos Totais, e Glicerina Livre e Total em B-100 Ésteres metílicos de biodiesel por Cromatografia Gasosa (2011).

Disponível em: <<http://www.astm.org/Standards/D6584.htm>>. Acesso em: 23/11/2012.

58. Comité Europeu de Normalização. EN 14103: Determinação do Teor de éster e ésteres metílicos de ácido linolênico por cromatografia gasosa (2003). Disponível em < <http://www.en-standard.eu/csn-en-14103-fat-and-oil-derivatives-fatty-acid-methyl-esters-fame-etermination-of-ester-and-linolenic-acid-methyl-ester-contents/?gclid=CJuLuPqSgbECFQgGnQodrH1Y7A>>. Acesso em: 23/01/2011.

59. WALPOLE, R. E. **Probabilidade e estatística para engenharia e ciência**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010.

60. PARDO, V. L.; FAGUNDES, C. A. M.; CALDAS, S. S.; KURZ, M. H.; CLEMENTIN, R. M.; D'OCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G. Development and Validation of a Method for the Determination of Fatty Acid Methyl Ester Contents in Tung Biodiesel and Blends. *Journal of the American Oil Chemist's Society* **2012**, 89, 631-637.

61. PRESTES, O.D. **Desenvolvimento e Validação de Método Multirresíduo para Determinação de Pesticidas em Arroz Polido utilizando Método Quechers Modificado, Clean-Up Dispersivo e GC-MS (NCI-SIM)**. 2007. 108 p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

62. MORAES, D. C. **Síntese de biodiesel etílico de girassol utilizando transesterificação alcalina seguido da adição on pot de H₂SO₄**. 2010. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, FURG, Rio Grande-RS.

63. VIEITEZ, I; SILVA, C; ALCKMIN, I; BORGES, G. R.; GROMPONE, M. A.; JACHMANIÁN, I. Continuous catalyst-free methanolysis and ethanolysis of soybean oil under supercritical alcohol/water mixtures. *Renewable Energy* **2010**, 35, 1976–1981.

64. KEERA, S.T.; EL SABAGH, S.M.; TAMAN, A.R. Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using alkaline catalyst. *Fuel* **2011**, 90, 42-47.

65. VIEIRA, J. A. V.; JUNIOR, L. S. C.; MENEZES, S. C.; PEREIRA, R. C. L.; ALBUQUERQUE, F. C.; FONSECA, F. A. S. Oligomerização do biodiesel de mamona durante o processo produtivo. **III Congresso Brasileiro de Mamona Energia e RicinoQuímica 2008**. Disponível em: < www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/cbm3/trabalhos/BIODIESEL/BD%2006.pdf >. Acesso em: 24/12/2012.

66. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* **2004**, 27, 771 – 78012

-
67. PIRARD, C.; WIDART, J.; NGUYEND, B. K.; DELEUZE, C.; HEUDT, L.; HAUBRUGE, E.; PAUWA, E.; FOCANT, J.F. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid–liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1152, 116 – 123.
68. PIZZUTTI, I.R.; KOK, A.; ZANELLA, R.; ADAIME, M.B.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O.D. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya 128 grain, without clean-up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1142, 123–136.
69. CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. B.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova* **2009**, 32, 1021-1030.
- 70 SOUSA, F. A.; COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R.; TEÓFILO, R. F.; NEVES, A. A.; PINHO, G. P. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. *Food Chemistry* **2012**, 135, 179 - 185.

11. ANEXO

ANEXO A - Cálculos estequiométricos do volume de MSTFA consumido para derivatizar 100 µL do padrão interno (S)-(-)-1,2,4-butanotriol e 0,1 g de biodiesel da mistura mamona e soja (30:70); cálculo do volume de MSTFA consumidos pelos contaminantes do biodiesel de mistura; e ainda, cálculo do consumo de MSTFA para sililar os contaminantes do biodiesel metílico de soja (referência).

Dados necessários para os cálculos estequiométricos:

$m_{\text{amostra}} = 0,1 \text{ g}$; $MM_{\text{Bd mistura}} = 315,55 \text{ g mol}^{-1}$; $MM_{\text{MSTFA}} = 199,25 \text{ g mol}^{-1}$;
 $MM_{(\text{S})-(-)-1,2,4\text{-butanotriol}} = 106,12 \text{ g mol}^{-1}$; $d_{\text{MSTFA}} = 1,075 \text{ g mL}^{-1}$; $V_{(\text{S})-(-)-1,2,4\text{-butanotriol}} = 100 \text{ µL}$ (conc, solução: 1 mg mL^{-1})

$$1 \text{ mL} \text{ --- } 1 \text{ mg}$$

$$0,1 \text{ mL} \text{ --- } x$$

$$x = 0,1 \text{ mg de (S)-(-)-1,2,4-butanotriol}$$

$$1 \text{ mol de (S)-(-)-1,2,4-butanotriol} \text{ --- } 106,12 \text{ g}$$

$$x \text{ --- } 1 \cdot 10^{-4} \text{ g}$$

$$x = 9,42 \cdot 10^{-7} \text{ mol de (S)-(-)-1,2,4-butanotriol}$$

Ao considerar que 1 mol de (S)-(-)-1,2,4-butanotriol contém 3 mols de hidrogênio ácido à reagir, logo são necessários 3 mols de MSTFA para cada mol de (S)-(-)-1,2,4-butanotriol:

$$1 \text{ mol de (S)-(-)-1,2,4-butanotriol} \text{ --- } 3 \text{ mols de MSTFA}$$

$$9,42 \cdot 10^{-7} \text{ mol de (S)-(-)-1,2,4-butanotriol} \text{ --- } x$$

$$x = 2,83 \cdot 10^{-6} \text{ mol de MSTFA}$$

$$1 \text{ mol de MSTFA} \quad \text{---} \quad 199,25 \text{ g}$$

$$2,83 \cdot 10^{-6} \text{ mol de MSTFA} \quad \text{---} \quad x$$

$$x = 5,64 \cdot 10^{-4} \text{ g de MSTFA}$$

$$1 \text{ mL de MSTFA} \quad \text{---} \quad 1,075 \text{ g}$$

$$x \quad \text{---} \quad 5,64 \cdot 10^{-4} \text{ g}$$

$x = 5,64 \cdot 10^{-4} \text{ mL}$ ($\times 1000$) = 0,525 μL de MSTFA são consumidos para derivatizar 100 μL (S)-(-)-1,2,4-butanotriol em solução (1 mg mL^{-1}).

Considerando que a amostra de biodiesel da mistura mamona e soja (30:70) têm 100% de pureza, 30% dos ésteres, referentes ao óleo de mamona, tem hidrogênios ácidos a reagir em 1 mol de biodiesel e que a razão molar com o MSTFA é (1:1). Então, 30% dos ésteres derivado do óleo de mamona em 0,1 g de biodiesel correspondem:

$$0,1 \text{ g de amostra} \quad \text{---} \quad 100\%$$

$$x \quad \text{---} \quad 30\%$$

$x = 0,03 \text{ g}$ da amostra correspondem aos ésteres derivados do óleo de mamona

$$1 \text{ mol de biodiesel de mamona} \quad \text{---} \quad 312,55 \text{ g}$$

$$x \quad \text{---} \quad 0,03 \text{ g}$$

$$x = 9,60 \cdot 10^{-5} \text{ mol de biodiesel de mamona}$$

$$1 \text{ mol de biodiesel de mamona} \quad \text{---} \quad 1 \text{ mol de MSTFA}$$

$$9,60 \cdot 10^{-5} \text{ mol de biodiesel de mamona} \quad \text{---} \quad x$$

$$x = 9,60 \cdot 10^{-5} \text{ mol de MSTFA}$$

$$1 \text{ mol de MSTFA} \quad \text{---} \quad 199,25 \text{ g}$$

$$9,60 \cdot 10^{-5} \text{ mol de MSTFA} \text{ --- } x$$

$$x = 0,019 \text{ g de MSTFA}$$

$$1 \text{ mL de MSTFA} \text{ --- } 1,075 \text{ g}$$

$$x \text{ --- } 0,019 \text{ g}$$

$$x = 0,0178 \text{ mL (x1000)} = 17,8 \text{ } \mu\text{L de MSTFA}$$

são consumidos para derivatizar 0,1 g de biodiesel metílico da mistura mamona e soja (30:70).

Considerando uma amostra dentro das especificações foi calculado o volume de derivatizante consumido por esses contaminantes. Por exemplo, em 0,1 g de amostra o limite máximo aceitável é 0,02% (m/m) de glicerol, então foi calculado o volume de MSTFA necessário para derivatizar esse percentual de glicerol na amostra:

$$0,1 \text{ g de amostra (biodiesel)} \text{ --- } 100\%$$

$$x \text{ --- } 0,02\%$$

$$x = 2 \cdot 10^{-5} \text{ g}$$

$$1 \text{ mol de glicerol} \text{ --- } 92,09 \text{ g}$$

$$x \text{ --- } 2 \cdot 10^{-5} \text{ g}$$

$$x = 2,17 \cdot 10^{-7} \text{ mol de glicerol}$$

$$1 \text{ mol de glicerol} \text{ --- } 3 \text{ mols de MSTFA}$$

$$2,17 \cdot 10^{-7} \text{ mol de glicerol} \text{ --- } x$$

$$x = 6,51 \cdot 10^{-7} \text{ mol de MSTFA}$$

$$1 \text{ mol de MSTFA} \text{ --- } 199,25 \text{ g}$$

$$6,51 \cdot 10^{-7} \text{ mol de MSTFA} \text{ --- } x$$

$$x = 1,30 \cdot 10^{-4} \text{ g de MSTFA}$$

$$1 \text{ mL de MSTFA} \text{ --- } 1,075 \text{ g}$$

$$x \text{ --- } 1,30 \cdot 10^{-4} \text{ g de MSTFA}$$

$$x = 1,21 \cdot 10^{-4} \text{ mL (x1000)} = 0,121 \text{ } \mu\text{L de MSTFA}$$

são consumidos para derivatizar 0,02% de glicerol em 0,1 g de amostra.