**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**UTILIZAÇÃO DE CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA PARA
A DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS EM
BIODIESEL: UMA ABORDAGEM METROLÓGICA**

WALDEMAR PACHECO DE OLIVEIRA FILHO

Tese apresentada como requisito
parcial à obtenção do título de Doutor.
Programa de Pós-Graduação em Química
Analítica e Inorgânica,
Laboratório de Química Ambiental,
Instituto de Química de São Carlos,
Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira
Rezende

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo
reservado na Biblioteca do IQSC-USP

SÃO CARLOS
2013

Ao Senhor, por ter tornado possível a conclusão deste trabalho.

Agradecimentos

À Danielle, pelo amor e convívio diário, e por fazer parte de minha vida junto com o João Felipe.

À Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende, pela amizade, compreensão, orientação presente e segura.

Ao Dr. Fábio da Silva Vinhado, pelo auxílio em várias etapas deste trabalho.

Aos Drs. Marcos Roberto Monteiro e Igor Renato Bertoni Olivares, pela contribuição efetiva e dissipação de dúvidas decorrentes durante o trabalho.

À Márcia Valéria de Souza Alves, Marcela Ganem Flores, Maria do Socorro Maia Quintino e Vinicius Leandro Skrobot, pelo apoio fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Centro de Pesquisas e Análises Tecnológicas da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, pela amizade e pelo excelente convívio.

Aos colegas do Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, pela ajuda e pelo companheirismo.

Ao meu pai, mãe e irmã, pelo incentivo e ajuda em momentos difíceis.

À Dilza Peixoto Batista Paiter, pelo amor e pelas orações.

Aos membros da Igreja Cristã Maranata do Lago Norte-DF, pelas orações e pelos momentos de alegria.

À ANP e ao IQSC-USP, pelo suporte operacional e financeiro.

RESUMO

O biodiesel é um combustível renovável composto por ésteres alquílicos obtidos a partir de óleos vegetais e/ou gorduras animais. É um produto que devido a sua composição, é susceptível a reações de oxidação, comprometendo assim sua qualidade e a adequação ao uso. Como prevenção de problemas decorrentes de sua oxidação, e também para adequação do produto aos requisitos de qualidade, produtores de biodiesel têm utilizado rotineiramente antioxidantes sintéticos em seus processos de obtenção de biodiesel. Estudos recentes têm apontado o TBHQ (*tert*-butil hidroquinona) como antioxidante sintético de melhor desempenho para biodiesel, mas além deste antioxidante, produtores nacionais têm adotado também o BHT (butil hidroxitolueno). Entretanto, ainda não há método analítico difundido entre os agentes econômicos envolvidos com a cadeia do biodiesel para a quantificação dos antioxidantes sintéticos para produtos finalizados. Esta determinação, em princípio, pode ser uma ferramenta importante em estudos que confrontam a oxidação do biodiesel com a concentração de determinado antioxidante que tenha sido adicionado quando da sua produção, ao longo de períodos de armazenamento; também em estudos que avaliem possíveis impactos ambientais causados pela utilização desses produtos, que apresentam toxicidade comprovada e possuem teores controlados pelo Ministério da Saúde para a indústria alimentícia. Dentre as técnicas analíticas utilizadas no desenvolvimento de métodos para quantificação dos antioxidantes sintéticos, destacam-se a voltametria (especificamente para TBHQ) e cromatografia líquida, mas ainda sem apresentarem um potencial de uso em larga escala pelos agentes de mercado. Neste trabalho, foi utilizada cromatografia em fase gasosa para o desenvolvimento de um novo método para a quantificação de TBHQ e BHT usados pelos produtores de biodiesel. Inicialmente, foram feitos testes com os antioxidantes fornecidos por um produtor, para verificação de seu uso como padrões de calibração, por meio de cromatografia gasosa com detecção por espectrômetro de massas. Em seguida, realizou-se o desenvolvimento do método propriamente dito, por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama. O método então foi otimizado, verificando-se possíveis limitações em relação às amostras analisadas, e então validado, conforme parâmetros previstos em protocolos internacionais. Na validação foram empregados métodos estatísticos pertinentes ao método desenvolvido, e os resultados de validação foram criticamente analisados segundo critérios de aceitação previamente estabelecidos. Destaque para valores de recuperação que oscilaram entre 92% e 106%. Foi também estimada a incerteza de medição, ao longo da faixa de trabalho, utilizando conceitos apresentados em guias internacionais de estimativa de incerteza de medição. Foi verificado que o modelo de regressão linear escolhido pode ter impacto direto nos valores de incerteza de medição, que oscilaram entre 1% e 40% dependendo da região da faixa de trabalho. O método então foi testado quanto à sua aplicabilidade, em amostras comerciais, e relacionando-se os resultados obtidos com os valores de estabilidade à oxidação dessas amostras. Aqui, o TBHQ também apresentou o melhor desempenho para adequação do biodiesel às especificações de qualidade, confirmando os dados disponíveis na literatura.

ABSTRACT

Biodiesel is a renewable fuel composed by alkyl esters generated from vegetable oils and/or animal fats. It's a susceptible product to oxidation reactions because its composition, thus compromising their quality and use. Currently, biodiesel manufacturers have used synthetic antioxidants in production processes, as prevention to oxidation problems, also as product adjustment to quality requirements. Recent studies have indicated TBHQ (tert-butyl hydroquinone) as the synthetic antioxidant with the best performance for biodiesel, but beyond this antioxidant, national manufacturers have also adopted the BHT (butylated hydroxytoluene). However, there is not a currently analytical method widespread among the economic agents involved in the chain of biodiesel for the quantification of synthetic antioxidants to finished products. At first, this determination can be an important tool to make advance to studies which check the relationship between biodiesel oxidation and the used antioxidant concentration, added in biodiesel production, at long biodiesel storage times. This determination, in principle, can be an important tool in studies which compare the oxidation of biodiesel with the concentration of a particular antioxidant which has been added at the time of its production, over periods of storage, also in studies to assess possible environmental impacts the use of these products, which have proven toxicity levels and possess controlled by the Ministry of Health for the food industry. Among the analytical techniques used in the development of methods for quantification of synthetic antioxidants, stand out voltammetry (specifically for TBHQ) and liquid chromatography, but still without presenting a potential for widespread use by the market agents. In this work, the gas chromatography was used as a new method development for TBHQ and BHT antioxidants (available in biodiesel manufacturers) determination. Initially, tests with antioxidants provided from a manufacturer were carried out, to verify their using as calibration standards conditions, performed by gas chromatography with mass spectrometer detector. Then, there was the development of the method itself, by gas chromatography with flame ionization detector. Then the method was optimized, verifying possible limitations on samples, and validated according to international protocols parameters provided. In this validation, statistical methods compatible to developed method were applied, and the validation results were critically analyzed according to previously established acceptance criteria. Recovery data between 92% and 106% are detached. In addition, the measurement uncertainty was estimated, using presented concepts in according with international guides of measurement uncertainty calculation. The impact of the adopted linear regression model in measurement uncertainty values was verified, as been a notable influence. These values stayed between 1% and 40%, depending of the test method work range. Finally, the new method was verified about its applicability, being carried out for commercial samples, and checking their obtained results and Oxidation Stability values relationship. Here, TBHQ also presented the best antioxidant performance for biodiesel suitability to quality requirements, in agreement with available data in literature.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE QUADROS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XV
1. Introdução	1
2. Objetivos do Trabalho	2
3. Revisão Bibliográfica	3
3.1 O biodiesel	3
3.1.1 Produção	3
3.1.2 Controle de qualidade do biodiesel	9
3.1.3 Histórico do biodiesel no Brasil	16
3.1.4 O processo de oxidação do biodiesel	24
3.2 Antioxidantes	29
3.2.1 Uso de antioxidantes em biodiesel	29
3.2.2 Metodologias desenvolvidas para determinação de antioxidantes sintéticos em biodiesel	34
3.3 Cromatografia em Fase Gasosa	39
3.3.1 Generalidades	39
3.3.2 Instrumentação	41
3.3.3 Métodos de derivatização	46
3.3.4 Cromatografia Gasosa e o biodiesel	47
3.4 Validação de métodos	49
3.4.1 Metrologia e Validação	49
3.4.2 Incerteza de Medição	54
4. Experimental	57
4.1 Material	58
4.1.1 Reagentes e solventes	58
4.1.2 Soluções	58
4.1.2.1 Soluções estoque de antioxidantes sintéticos	58
4.1.2.2 Soluções de calibração preparadas a partir das soluções estoque	59
4.1.2.3 Preparo de soluções de amostras	60

4.1.3 Vidrarias e instrumentos volumétricos	60
4.1.3.1 Vidrarias	60
4.1.3.2 Instrumentos volumétricos	61
4.1.4 Balança	61
4.1.5 Instrumentação analítica	61
4.1.5.1 Aparelhagem utilizada nos experimentos de caracterização dos antioxidantes sintéticos	61
4.1.5.2 Aparelhagem utilizada nas demais etapas experimentais	62
4.2 Metodologia	62
4.2.1 Caracterização dos antioxidantes sintéticos	62
4.2.2 Desenvolvimento do método proposto	64
4.2.3 Otimização do método	69
4.2.4 Validação do método	69
4.2.5 Incerteza de medição	72
4.2.6 Aplicabilidade do método	74
5. Resultados e Discussão	75
5.1 Caracterização dos antioxidantes sintéticos	75
5.2 Desenvolvimento do método proposto	79
5.3 Otimização do método	81
5.4 Validação do método	85
5.4.1 Exatidão	85
5.4.2 Precisão	85
5.4.3 Fidelidade – Repetibilidade de áreas	85
5.4.4 Fidelidade – Repetibilidade de tempos de retenção	85
5.4.5 Linearidade	87
5.4.6 Limite de Detecção	96
5.4.7 Limite de Quantificação	101
5.4.8 Sensibilidade	103
5.4.9 Seletividade	103
5.4.10 Estabilidade	103
5.4.11 Intervalo de aplicação	105
5.5 Incerteza de medição	105
5.6 Aplicabilidade do método	128
6. Conclusão	134

7. Referências Bibliográficas	137
ANEXO 1 – Trabalhos publicados	145
ANEXO 2 – Equações Complementares utilizadas nas regressões lineares	151
ANEXO 3 – Equações utilizadas nos testes estatísticos para definição do método de regressão	153
ANEXO 4 – Parâmetros de qualidade para algumas amostras comerciais de biodiesel utilizadas neste trabalho	157

LISTA DE ABREVIATURAS

A/D – ANALÓGICO / DIGITAL

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS

ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E
BIOCOMBUSTÍVEIS

AOM – ACCELERATED OXIDATION METHOD

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS

B100 – BIODIESEL

B20 – MISTURA CONSTITUÍDA DE 20% DE BIODIESEL EM ÓLEO DIESEL
FÓSSIL

B6 – MISTURA CONSTITUÍDA DE 6% DE BIODIESEL EM ÓLEO DIESEL
FÓSSIL

BHA – BUTIL HIDROXIANISOL

BHT – BUTIL HIDROXITOLUENO

CEIB – COMISSÃO EXECUTIVA INTERMINISTERIAL DE BIODIESEL

CG – CROMATOGRAFIA GASOSA

CGL – CROMATOGRAFIA GÁS-LÍQUIDO

CGS – CROMATOGRAFIA GÁS-SÓLIDO

CITAC – COOPERATION ON INTERNATIONAL TRACEABILITY IN
ANALYTICAL CHEMISTRY

CLAE – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

CLC – CURVA LIMITE DE CONFIANÇA

CLP – CURVA LIMITE DE PREVISÃO

CTAB – CETYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE

CV – COEFICIENTE DE VARIAÇÃO

D/A – DIGITAL / ANALÓGICO

DIC – DETECTOR DE IONIZAÇÃO POR CHAMA

EM – ESPECTROMETRIA DE MASSAS

EN – EUROPÉENNE NORME

EUA – ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA

GC – GAS CHROMATOGRAPHY

GUM – GUIDE OF UNCERTAINTY MEASUREMENT

HT – HIGH TEMPERATURE

IA – ÍNDICE DE ACIDEZ
IEC – INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION
IEO – INDUCED ELECTRON OXIDATION
IP – ÍNDICE DE PERÓXIDOS
ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION
LCI – LIMITE DE CONFIANÇA INFERIOR
LCS – LIMITE DE CONFIANÇA SUPERIOR
LD – LIMITE DE DETECÇÃO
LII – LÍMPIDO E ISENTO DE IMPUREZAS
LP – LIMITE DE PREVISÃO
LPI – LIMITE DE PREVISÃO INFERIOR
LPS – LIMITE DE PREVISÃO SUPERIOR
LQ – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO
MME – MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA
MMQO – MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS ORDINÁRIO
MMQP – MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS PONDERADO
MS – MASS SPECTROMETRY
MSTFA – N-N-TRIMETILSILILTRIFLUOROACETAMIDA
NBR – NORMA BRASILEIRA
NIST – NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY
P-DSC – CALORIMETRIA DIFERENCIALDE VARREDURA SOB PRESSÃO
PFC – PONTO DE FULGOR CALCULADO
PG – PROPIL GALATO
PNPB – PROGRAMA NACIONAL DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL
RBC – REDE BRASILEIRA DE CALIBRAÇÃO
RCLA – REATORES CONTÍNUOS DE LEITO AGITADO
RELACRE – ASSOCIAÇÃO DE LABORATÓRIOS ACREDITADOS DE PORTUGAL
RSSOT – RAPID SMALL SCALE OXIDATION TEST
S10 – ÓLEO DIESEL COM TEOR MÁXIMO DE ENXOFRE DE 10 mg/kg
TBHQ – TERT-BUTIL HIDROQUINONA
TMS – TRIMETILSILIL
UV – ULTRAVIOLETA
VVC – VALOR VERDADEIRO CONVENCIONAL

LISTA DE TABELAS

1. Composição percentual em ácidos graxos para algumas matérias-primas _____	9
2. Parâmetros de qualidade para o biodiesel _____	10
3. Especificações do biodiesel _____	15
4. Métodos de cromatografia gasosa em análises de biodiesel _____	48
5. Parâmetros gerais para validação de métodos _____	52
6. Reagentes e solventes _____	58
7. Soluções estoque de antioxidantes sintéticos _____	59
8. Soluções de calibração _____	59
9. Preparo de soluções para leitura de amostras _____	60
10. Condições de operação CG-EM _____	63
11. Condições de operação _____	66
12. Protocolo de validação _____	72
13. Teor de água nas amostras utilizadas inicialmente no desenvolvimento da metodologia _____	83
14. Teor de água para o novo conjunto de amostras _____	84
15. Resultados da validação _____	86
16. Teste Jacknife para TBHQ _____	89
17. Teste Jacknife para BHT _____	90
18. Teste Ryan-Joiner para TBHQ _____	91
19. Teste Ryan-Joiner para BHT _____	91
20. Teste de Durbin-Watson para TBHQ _____	92
21. Teste de Durbin-Watson para BHT _____	92
22. Teste de Brown-Forsythe para BHT _____	94
23. Limites de detecção e quantificação _____	101
24. Quantificação de amostras com concentração próxima ao LD e ao LQ _____	102
25. Recuperações para concentrações próximas ao LQ _____	102
26. Comparação dos coeficientes angulares _____	103
27. Estimativa da Estabilidade _____	104
28. Repetibilidade do preenchimento do balão volumétrico _____	113

29. Repetibilidade de volume da micropipeta_____	118
30. Ensaio de repetibilidade_____	123
31. Resultados de Concentração e de Estabilidade à Oxidação_____	129
32. Resultados_____	131

LISTA DE QUADROS

1. Determinação de antioxidantes em biodiesel – incerteza das massas _____	111
2. Determinação de antioxidantes em biodiesel – incerteza do volume do balão para solução estoque _____	112
3. Determinação de antioxidantes em biodiesel – incerteza da Concentração da solução estoque _____	116
4. Determinação de antioxidantes em biodiesel – incerteza do Volume pipetado de solução estoque _____	117
5. Determinação de antioxidantes em biodiesel – incerteza da massa do padrão 1 _____	120
6. Determinação de antioxidantes em biodiesel – incerteza combinada dos padrões _____	121
7. Determinação de antioxidantes em biodiesel – incerteza final _____	122

LISTA DE FIGURAS

1. Reação de Transesterificação _____	3
2. Gráfico quantitativo de conversão em uma reação progressiva de transesterificação _____	4
3. Fluxograma esquemático de processo empregado para a produção de biodiesel _____	6
4. Mapa evidenciando a estratégia do governo de explorar o potencial de matéria-prima para produção do biodiesel por região _____	18
5. Cadeia de produção e distribuição de biodiesel no Brasil _____	19
6. Evolução da produção de biodiesel no Brasil _____	20
7. Infraestrutura da produção de Biodiesel no Brasil - 2011 _____	20
8. Evolução das matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel _____	21
9. Planta de usina produtora de biodiesel _____	21
10. Ricinoleato de metila, constituinte majoritário do biodiesel de mamona _____	24
11. Equipamento Rancimat _____	27
12. Gráfico obtido no ensaio Rancimat de uma amostra de biodiesel _____	28
13. Alguns antioxidantes sintéticos _____	29
14. Espectro obtido em estudo por espectrofotometria UV-Visível _____	32
15. Curvas de nível utilizadas para demonstrar graficamente a eficiência do TBHQ _____	32
16. Cromatograma ilustrado em Tagliabue <i>et al</i> _____	34
17. Reação de oxidação de hidroquinona para quinona _____	35
18. Voltamogramas cíclicos evidenciando que o uso de surfactante melhora o sinal eletroquímico para determinação _____	35
19. Voltamogramas evidenciando que o CTAB é o surfactante que melhor potencializa o sinal de oxidação do TBHQ _____	36
20. Voltamogramas, para adição-padrão na quantificação de TBHQ em biodiesel _____	36
21. Voltamograma com potencial selecionado para aplicar a quantificação _____	37
22. Cromatogramas obtidos por cromatografia em fase gasosa em	

método para aplicação em óleos vegetais _____	38
23. Cromatograma típico obtido por separação dos componentes A e B por Cromatografia em Fase Gasosa _____	40
24. Componentes básicos de um sistema cromatográfico _____	42
25. Esquema básico de um detector de ionização por chama _____	45
26. Diagrama de Ishikawa utilizado na estimativa de incerteza da Determinação do Ponto de Fulgor Calculado para biodiesel _____	56
27. Reação geral de silanização do TBHQ com MSTFA _____	65
28. Esquema-resumo da metodologia proposta _____	68
29. Cromatograma de corrente iônica total obtido no experimento CG-EM para TBHQ comercial _____	75
30. Cromatograma de corrente iônica total obtido no experimento CG-EM para TBHQ comercial _____	76
31. Espectro de massas para pico em 9,34 minutos no cromatograma da Figura 29 _____	76
32. Espectro de massas para pico em 6,29 minutos no cromatograma da Figura 29 _____	77
33. Espectro de massas para pico em 9,64 minutos no cromatograma da Figura 30 _____	77
34. Espectro de massas para pico em 8,4 minutos no cromatograma da Figura 30 _____	77
35. Espectro de massas para pico em 6,86 minutos no cromatograma da Figura 30 _____	78
36. Espectro de massas para pico em 8,93 minutos no cromatograma da Figura 30 _____	78
37. Cromatograma obtido para amostra de biodiesel livre de antioxidantes _____	79
38. Cromatograma obtido para amostra de biodiesel fortificada com TBHQ _____	80
39. Cromatograma obtido para amostra de biodiesel fortificada com BHT _____	80
40. Região de cromatograma com destaque para o pico correspondente à antioxidante TBHQ, para amostra de biodiesel com 982 mg/kg de teor de água e 509 mg/kg de água _____	84

41. Gráfico de resíduos obtido para TBHQ _____	88
42. Gráfico de resíduos obtido para BHT _____	89
43. Gráfico de Durbin-Watson para TBHQ _____	93
44. Gráfico de Durbin-Watson para BHT _____	93
45. Curva analítica obtida por MMQP para TBHQ _____	95
46. Curva analítica obtida por MMQO para BHT _____	96
47. Utilização do método do cruzamento das curvas de previsão e analítica, para a obtenção dos limites de detecção e quantificação _____	97
48. Relação entre os desvios-padrão das áreas e a massa de antioxidante para TBHQ _____	100
49. Estimativa da estabilidade _____	104
50. Diagrama de Ishikawa para a metodologia proposta _____	106
51. Relação entre a incerteza expandida e a concentração de antioxidante _____	125
52. Regressão de quarto grau entre a incerteza expandida e o valor da concentração de antioxidante TBHQ _____	126
53. Regressão de segundo grau entre a incerteza expandida e o valor da concentração de antioxidante BHT nas amostras utilizadas para verificação da aplicabilidade do método _____	127
54. Concentração encontrada de TBHQ em amostras comerciais e suas respectivas Estabilidades à Oxidação _____	130
55. Concentração encontrada de BHT em amostras comerciais e suas respectivas Estabilidades à Oxidação _____	130
56. Cromatogramas na região do pico de TBHQ de amostras Quantificadas _____	133
57. Cromatogramas na região do pico de BHT de amostras Quantificadas _____	133

1. INTRODUÇÃO

O biodiesel é um biocombustível produzido a partir de óleos vegetais e/ou gorduras animais. Sendo assim, existe um grande conjunto de matérias-primas que possibilitam a produção de biodiesel. Estas matérias-primas incluem óleos como de soja, caroço de algodão, palma, amendoim, colza/canola, girassol, açafrão, coco, dentre outros, além de gorduras (usualmente sebo bovino), bem como óleos de descarte, como óleos usados em frituras¹.

Por se tratar, em sua composição majoritária, de alquil ésteres de ácidos graxos, o biodiesel é susceptível à oxidação quando exposto ao ar, e os produtos dessa oxidação, em última análise, afetam a qualidade do combustível. Em função disso, a estabilidade (ou resistência, nesse caso) à oxidação tem sido objeto de várias pesquisas²⁻¹¹. Um parâmetro nas especificações de qualidade¹²⁻¹⁵ para a estabilidade à oxidação foi incluído, e o método utilizado para avaliar a estabilidade à oxidação emprega o equipamento Rancimat¹⁶.

Para garantir que o biodiesel produzido atenda aos requisitos definidos nessas especificações de qualidade, comumente nos processos de produção são usados antioxidantes sintéticos¹¹. Ocorre, porém, que após a sua comercialização por parte da usina produtora, ou seja, após a sua certificação de qualidade, o biodiesel pode ficar armazenado por meses até ser misturado ao óleo diesel de origem fóssil, na proporção estabelecida por legislação vigente¹⁷⁻¹⁸. Durante esse período de armazenamento, dependendo das condições de exposição ao ar e calor, pode haver comprometimento da qualidade do combustível no que diz respeito à sua oxidação. Considerando que cerca de 80 % do biodiesel nacional é proveniente de óleo de soja¹⁷, que é uma matéria-prima que gera um biodiesel ainda mais vulnerável quanto à oxidação, e que os compostos antioxidantes sintéticos possuem certa toxicidade¹⁹, é de grande utilidade a disponibilidade de metodologias analíticas confiáveis que determinem teores de antioxidantes sintéticos após a produção de biodiesel. Com essas metodologias, pode-se facilmente avaliar a

concentração de antioxidante sintético em função do tempo de armazenamento do produto, por exemplo.

Os laboratórios que são responsáveis por certificação de biodiesel no Brasil devem cumprir uma série de exigências acerca da qualidade de seus resultados de ensaio²⁰. Tais exigências seguem como referências diretivas internacionais baseadas em normas de qualidade para laboratórios de ensaio e calibração²¹. Dentro dessas diretivas, está a devida validação de métodos, que ao serem propostos devem cumprir etapas específicas para serem validados. Assim sendo, a proposição de um método analítico para determinação de antioxidantes sintéticos em biodiesel, como qualquer outro método a ser utilizado em laboratórios de certificação, deve ser devidamente validado.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

Este trabalho tem como objetivo principal propor um método de determinação dos dois antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de biodiesel no Brasil - o TBHQ (tert-butil hidroquinona) e o BHT (butil hidroxitolueno) - e a validação intralaboratorial desse método, dando um enfoque metrológico ao trabalho. Dentro desse objetivo principal, são propostas as seguintes etapas:

- 1) Desenvolvimento de uma metodologia para identificação e quantificação dos antioxidantes sintéticos de interesse, utilizando cromatografia em fase gasosa com detecção de ionização por chama, verificando condições que permitam um desempenho satisfatório;**
- 2) Aplicação da metodologia considerando o biodiesel comercializado no país e as condições técnicas das usinas produtoras e dos laboratórios de certificação de biodiesel;**
- 3) Devida validação da metodologia, seguindo linhas gerais de protocolo de validação aceitas internacionalmente, incluindo estimativa de incerteza de medição adequada.**

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O biodiesel

3.1.1 Produção

O biodiesel é composto de alquil ésteres de ácidos graxos, e sua obtenção é resultado de uma reação química denominada transesterificação. Nesta reação, óleos vegetais e/ou gordura animal reagem na presença de um catalisador (usualmente uma base) com um álcool (usualmente metanol) para produzir os alquil ésteres correspondentes (para o caso do metanol, os ésteres metílicos) da mistura de ácidos graxos que é encontrada no óleo vegetal ou na gordura animal de origem. A Figura 1 apresenta a reação de transesterificação.

Figura 1 – Reação de transesterificação. R_1 , R_2 e R_3 representam as cadeias de ácidos graxos. O álcool empregado para a produção de biodiesel é geralmente o metanol ($R_4 = CH_3$)²¹. [Retirado de GERIS, R; DOS SANTOS, AC; AMARAL, BA; MAIA, IS; CASTRO, VD; CARVALHO, JRM. *Química Nova* 30,5, 1369-1373 (2007)²²]

Diacylgliceróis e monoacylgliceróis são formados como intermediários durante a reação de transesterificação. A Figura 2 demonstra qualitativamente a relação entre conversão e tempo de reação para um processo em que di- e monoacylgliceróis estão representados como intermediários de reação. Aspectos quantitativos desta figura, como a concentração final dos vários tipos

de glicérides e a concentração máxima que di- e monoacilgliceróis podem atingir durante o processo, podem variar consideravelmente de reação para reação, dependendo das condições em que ela é realizada. A escala da Figura 2 também pode variar se a concentração (em mol/L) dos componentes é empregada em substituição à taxa de conversão.

Figura 2 – Gráfico quantitativo de conversão em uma reação progressiva de transesterificação, indicando as concentrações relativas do óleo vegetal (triacilgliceróis), di- e monoacilgliceróis intermediários, bem como ésteres metílicos produzidos. Detalhes mais precisos podem variar de reação para reação, conforme mencionado no texto¹.

Várias revisões bibliográficas relacionadas à transesterificação como processo para a produção de biodiesel já foram publicadas na literatura²³⁻²⁷. Da mesma forma, a busca em otimizar a transesterificação tem sido motivo para numerosos artigos científicos. Geralmente, a transesterificação pode ser realizada por catálise ácida ou básica. No entanto, em catálise homogênea,

catalisadores alcalinos (hidróxidos de sódio e de potássio; ou os alcóxidos correspondentes) proporcionam processos muito mais rápidos que catalisadores ácidos²⁸.

Em princípio, a transesterificação é uma reação reversível, embora durante a produção de ésteres alquílicos de óleos vegetais, isto é, o biodiesel, a reação reversa não ocorra ou seja consideravelmente negligenciável porque o glicerol formado na reação não é miscível no produto, levando a um sistema de duas fases. A cinética de transesterificação do óleo de soja com metanol foi definida como de pseudoprimeira ordem ou de segunda ordem²⁹. No entanto, dados cinéticos divulgados foram investigados e diferenças importantes foram identificadas. A cinética de reação do metanol com óleo de girassol, por exemplo, a uma razão molar metanol: óleo de 3:1 foi demonstrada como de segunda ordem no início da reação, mas a velocidade da reação decresceu à medida que o glicerol foi sendo gerado no meio reacional³⁰. Foi demonstrado que a reação imediata (reação em que todas as três posições do triacilglicerol reagem virtualmente ao mesmo tempo para fornecer três moléculas de ésteres alquílicos e uma de glicerol) originalmente proposta²⁹ como parte da reação é improvável, que a cinética de segunda ordem não foi seguida, e que o fenômeno de miscibilidade tem uma importância significativa no processo³¹. O motivo é que o óleo vegetal de origem e o metanol são muito miscíveis. O fenômeno da miscibilidade resulta em uma fase acelerada na formação dos ésteres metílicos, como indicado quantitativamente na Figura 2. A formação de glicerol a partir dos triacilgliceróis procede por etapas através dos di- e monoacilgliceróis, com uma molécula do alquil éster de ácido graxo sendo formada em cada etapa. A partir da observação de que diacilgliceróis atingem sua concentração máxima anteriormente aos monoacilgliceróis, foi deduzido que a última etapa, correspondente à formação de glicerol a partir dos monoacilgliceróis, é procedida mais rapidamente do que a formação de glicerol a partir dos diacilgliceróis³².

A química descrita fornece os alicerces para a produção industrial de biodiesel. Por outro lado, o processamento e a qualidade do biodiesel estão fortemente relacionados. Os processos utilizados para refinar as matérias-primas e convertê-las em biodiesel determinam se o combustível irá atender às especificações técnicas necessárias. A Figura 3 apresenta um diagrama

esquemático do processo envolvido na produção de biodiesel a partir de matérias-primas contendo um baixo teor de ácidos graxos livres. Estas incluem óleo de soja, canola (colza) e alguns tipos de óleos de fritura oriundos de restaurantes e atividades afins. O álcool, o catalisador e o óleo são combinados em um reator e agitados por aproximadamente 1 h a 60 °C. Plantas de pequeno porte geralmente utilizam reatores de batelada³³, mas a maioria das plantas de grande porte (acima de 4 milhões de litros / ano) utiliza processos de fluxo contínuo envolvendo RCLA (Reatores Contínuos de Leito Agitado) ou reatores de fluxo pistonado (*plug flow*). A reação é muitas vezes efetuada em duas etapas em que aproximadamente 80 % do álcool e do catalisador são adicionados no primeiro estágio RCLA. Depois, o produto derivado deste reator passa por um processo de remoção do glicerol formado na reação, antes de dar entrada no segundo reator RCLA. Os 20 % remanescentes de álcool e catalisador são adicionados nesse segundo reator. Este sistema dá condições de se atingir uma reação completa com o potencial de poder empregar menos álcool que os processos realizados em uma única etapa¹.

Figura 3 – Fluxograma esquemático do processo empregado para a produção de biodiesel¹.

Após a reação, o glicerol é quase totalmente removido dos ésteres metílicos. Devido à baixa solubilidade do glicerol na fase éster, esta separação geralmente ocorre com rapidez e pode ser obtida em decantadores ou pelo emprego de uma centrífuga. O excesso de metanol tende a se comportar como solvente e pode diminuir a eficiência da separação. No entanto, este excesso de metanol não é geralmente removido do meio, devido à possibilidade de reversão da reação de transesterificação. Água também pode ser agregada ao meio reacional depois que a transesterificação está completa para melhorar a separação do glicerol³³⁻³⁴.

Observando a Figura 3, após a etapa de separação do glicerol, os ésteres metílicos sofrem uma etapa de neutralização e passam então por um seqüestrador de metanol, geralmente um processo de separação a vácuo ou um evaporador de filme líquido descendente (*falling film*), antes mesmo da etapa de lavagem aquosa. O ácido é adicionado ao produto para neutralizar qualquer catalisador residual e quebrar qualquer quantidade de sabão que tenha se formado durante a reação. Sabões reagirão com o ácido para formar sais solúveis em água e ácidos graxos livres, de acordo com a seguinte equação:

Os sais serão removidos durante a etapa de lavagem aquosa e os ácidos graxos livres permanecerão no biodiesel. A etapa de lavagem aquosa tem o objetivo de remover qualquer quantidade residual de catalisador, sabões, sais, metanol ou glicerol livre do produto final. A neutralização antes da lavagem aquosa reduz a quantidade de água necessária para o processo e minimiza a tendência à formação de emulsões, quando a água de lavagem é adicionada ao biodiesel. Após o processo de lavagem, qualquer água residual é removida do biodiesel por um processo de evaporação a vácuo.

A fase glicerínica que deixa o decantador, geralmente, contém apenas 50 % de glicerol. Esta fase também contém algum metanol excedente e a maior parte do catalisador e sabões formados no processo. Nesta forma, o glicerol tem baixo valor de mercado e sua disposição pode ser relativamente

difícil. O seu conteúdo em metanol o classifica como um efluente tóxico e perigoso. A primeira etapa no refino do glicerol é usualmente orientada à adição de ácido para quebrar os sabões em ácidos graxos livres e sais. Os ácidos graxos livres não são solúveis no glicerol e vão flotar à superfície da mistura, de onde podem ser removidos e reciclados. Tais ácidos podem ser reaproveitados no processo através de uma esterificação³⁵. Os sais que permanecem no glicerol podem então precipitar da solução, apesar de tal fato depender fortemente da composição química do meio. Uma opção freqüentemente considerada para o processo é a utilização de hidróxido de potássio como catalisador da reação e ácido fosfórico para a etapa de neutralização, de forma que o sal formado seja o fosfato de potássio, que pode ser utilizado como fertilizante. Após acidificação e separação dos ácidos graxos livres, o metanol presente no glicerol é removido por evaporação a vácuo, ou outro tipo de evaporação. Nesta etapa, o glicerol deve apresentar uma pureza de aproximadamente 85 % e pode ser tipicamente vendido para uma unidade de refino. O processo de refino do glicerol eleva a sua pureza a 99,5-99,7 %, empregando processos de destilação a vácuo ou de troca iônica¹.

O metanol, que é removido dos ésteres metílicos e do glicerol, apresenta a tendência de absorver a água que possa ter sido formada no processo. Esta água deverá ser removida em uma coluna de destilação antes que o metanol possa ser retornado ao processo. Esta etapa é mais complicada se o álcool utilizado na reação formar um azeótropo com água, como o etanol ou o isopropanol. Neste caso, uma peneira molecular deverá ser utilizada para remover a água.

Como mencionado anteriormente, a escolha da matéria-prima é de grande relevância para as características de um biodiesel final. Algumas matérias-primas possuem em sua composição maior presença de cadeias curtas (até 12 átomos de carbono), denominadas láuricas, têm como exemplo palmiste (caroço da palma), coco e babaçu. Outras já possuem composição mais comum, com cadeias carbônicas predominantes com tamanho médio (entre 14 e 18 átomos de carbono), com insaturações ou não. A tabela 1 apresenta de forma resumida a composição, em termos de tamanho de cadeias carbônicas, de ácidos graxos para as matérias-primas mais utilizadas para a produção de biodiesel.

**TABELA 1 – COMPOSIÇÃO PERCENTUAL EM ÁCIDOS GRAXOS PARA
ALGUMAS MATÉRIAS-PRIMAS***

Óleo/ Gordura	≤10:0	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Soja	-	0,1	0,1	6-13	-	2-5	20-30	50-60	5-11
Milho	-	-	1-2	8-13	-	2-5	19-49	34-64	-
Algodão	-	0,1	0-2	20-29	2	1-4	13-35	40-57	0,6
Canola	-	-	-	4,3	-	1,3	59,9	21,1	13,2
Sebo (bovino)	-	0,1	2,8-8	23-37	6	14-29	37-50	1-5	0,9
Girassol	-	-	-	6-11	-	3-6	16-29	52-74	-
Palma (polpa)	-	0,1	1,0	42,8	-	4,5	30-45	9-26	0,2
Palma (caroço)	7	51	17	8	-	2	13	2	-
Coco	12	44,6	16,8	8,2	-	3	10	3	-
Babaçu	10	45	17	9	-	3	10	3	-

(*) C10:0 corresponde a uma cadeia de 10 átomos de carbono sem insaturações.

C18:1 corresponde a uma cadeia de 18 átomos de carbono com uma insaturação.

Fonte: Associação Brasileira de Engenharia Automotiva

Como se pode perceber pelos dados da Tabela 1, a variação entre as composições de matérias-primas é grande, resultando também numa grande diferença de composição entre os tipos de biodiesel que podem ser produzidos. Aqueles que possuem uma composição mais saturada (exemplo da palma e do sebo, ricos em C16:0 e C18:0), tendem a apresentar propriedades benéficas à estabilidade à oxidação, porém problemas de congelamento em temperaturas mais baixas. Aqueles que possuem uma composição mais insaturada (exemplo da soja e da canola, ricas em C18:1 e C18:2), tendem a não terem problemas com baixas temperaturas, mas são mais vulneráveis à oxidação. Mais adiante o assunto da oxidação do biodiesel será tratado com mais detalhes.

3.1.2 Controle de qualidade do biodiesel

O principal critério para a qualidade do biodiesel é o atendimento a um padrão apropriado. Geralmente, a qualidade do combustível pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a qualidade da matéria-prima, a

composição em ácidos graxos do óleo vegetal ou gordura animal de origem, o processo produtivo, o emprego de outros materiais no processo e parâmetros posteriores à produção.

Quando as especificações são atendidas, o biodiesel pode ser utilizado na maioria dos motores a diesel modernos, sem neles exigir qualquer modificação, e sem oferecer comprometimento da durabilidade e da confiabilidade do motor. Mesmo quando utilizado em mistura com diesel de petróleo, o biodiesel deve atender às especificações, independentemente dos teores empregados. Enquanto algumas propriedades das especificações, como número de cetano e densidade, refletem as propriedades das substâncias que compõem o biodiesel, outras propriedades fornecem uma indicação da qualidade obtida no processo de produção, como teor de éster e glicerídeos. A Tabela 2 lista os parâmetros de qualidade previstos na especificação brasileira¹⁴ e de que forma cada parâmetro está relacionado com a qualidade do biodiesel, tomando como base possíveis danos ao consumidor, motores e ao meio ambiente quando do não-atendimento às especificações^{15,36}.

TABELA 2 – PARÂMETROS DE QUALIDADE PARA O BIODIESEL

Parâmetro	Danos ao consumidor e aos motores	Danos ao Meio Ambiente
Aspecto	Indica a uniformidade do combustível, bem como a isenção de impurezas grosseiras geradas no processo produtivo ou contaminação e/ou degradação quando estocado por longos períodos. Tais impurezas ou contaminação podem levar ao entupimento precoce de filtros.	Mau funcionamento dos bicos injetores, formação de depósitos ricos em carbono na câmara de combustão e aumento das emissões.
Massa específica a 20 °C	Valores de densidade divergentes daqueles da especificação levam a uma significativa variação na massa de combustível injetada, o que dificulta a obtenção de uma mistura ar/combustível balanceada, podendo levar o motor a perder potência e aumentar o consumo de combustível, em caso de uma mistura rica e formação de depósitos no caso de uma mistura pobre.	Aumento das emissões de gases poluentes e particulados no meio ambiente.

TABELA 2 – PARÂMETROS DE QUALIDADE PARA O BIODIESEL (continuação)

Parâmetro	Danos ao consumidor e aos motores	Danos ao Meio Ambiente
Viscosidade Cinemática a 40 °C	Valores de viscosidade fora da faixa especificada podem levar a perda de potência, além de serem inadequados aos tamanhos e ao tipo dos sistemas de injeção dos motores.	Aumento das emissões de gases poluentes e particulados no meio ambiente.
Teor de água	Teores de água acima do previsto na especificação podem causar crescimento microbológico durante o armazenamento, antes e depois da mistura com óleo diesel, causando entupimento de filtros, aumento da acidez (por reações de hidrólise) e conseqüente corrosão às partes do motor.	Mau funcionamento dos bicos injetores, aumento da formação de depósitos de carbono e, conseqüente aumento das emissões.
Contaminação Total	Indica o potencial do combustível em formar partículas insolúveis, inicialmente invisíveis. Valores acima da especificação configuram um produto com grande tendência de formação de partículas insolúveis, ou presença de sabões e sedimentos, gerando entupimento de filtros.	Mau funcionamento dos bicos injetores, aumento da formação de depósitos de carbono e, conseqüente aumento das emissões.
Ponto de Fulgor	Essa característica é um importante indicativo de segurança ao consumidor no que tange ao manuseio, armazenamento e transporte.	Não se aplica.
Teor de Éster	Indica a pureza do biodiesel, acusando presença de outras substâncias que não são ésteres alquílicos. Teores acima do especificado dessas substâncias podem causar aumento da acidez do produto, corrosão, queimas incompletas e formação de depósitos, causando também entupimento de filtros.	Mau funcionamento dos bicos injetores, aumento da formação de depósitos de carbono e, conseqüente aumento das emissões.

TABELA 2 – PARÂMETROS DE QUALIDADE PARA O BIODIESEL (continuação)

Parâmetro	Danos ao consumidor e aos motores	Danos ao Meio Ambiente
Cinzas Sulfatadas	Teores de cinzas elevados indicam presença de abrasivos sólidos, sabões e catalisadores remanescentes. Essas substâncias podem promover desgaste no sistema de injeção e em outras partes do motor, além de formação de depósitos.	Mau funcionamento dos bicos injetores, aumento da formação de depósitos de carbono e, conseqüente aumento das emissões.
Enxofre Total	Teores elevados de enxofre no combustível podem comprometer o desempenho do sistema de controle de emissões dos motores.	As emissões ricas em enxofre contaminam a atmosfera contribuindo com chuvas ácidas.
Sódio + Potássio	Teores acima da especificação indicam presença de abrasivos sólidos, sabões e catalisadores remanescentes do processo de produção. Essas substâncias podem promover desgaste no sistema de injeção e em outras partes do motor, além de formação de depósitos.	Mau funcionamento dos bicos injetores, aumento da formação de depósitos de carbono e, conseqüente aumento das emissões.
Cálcio + Magnésio	Teores acima da especificação indicam presença de sabões responsáveis pelo travamento da bomba de injeção. Também podem causar os mesmos danos citados para sódio + potássio.	Mau funcionamento dos bicos injetores, aumento da formação de depósitos de carbono e, conseqüente aumento das emissões.
Fósforo	Alta concentração de fósforo pode comprometer conversores catalíticos usados em sistemas de controle de emissões.	Descontrole dos sistemas de injeção, gerando aumento significativo das emissões.

TABELA 2 – PARÂMETROS DE QUALIDADE PARA O BIODIESEL (continuação)

Parâmetro	Danos ao consumidor e aos motores	Danos ao Meio Ambiente
Corrosividade ao cobre	Indica o potencial do combustível de corrosão quando em contato com peças de cobre ou ligas contendo cobre presentes no motor. Em caso de valor fora de especificação, o produto ser muito ácido, gerando desgaste prematuro dos componentes do motor, e aumento do consumo de combustível.	Mau funcionamento de várias partes do motor, causando aumento significativo das emissões.
Ponto de entupimento de filtro a frio	Indica o potencial do combustível em entupir filtros a baixas temperaturas. Valores altos podem acarretar em solidificação do produto no tanque, comprometendo todo o funcionamento do motor.	Não se aplica.
Índice de acidez	Determina o nível de ácidos graxos livres presentes no biodiesel, formados durante a produção. Índices altos podem acarretar em corrosão de partes do motor e formação de depósitos.	Mau funcionamento de várias partes do motor, causando aumento significativo das emissões.
Glicerol livre	Altos níveis de glicerina livre podem causar formação de depósitos no injetor, obstrução do sistema e acúmulo de glicerina no fundo do tanque.	Mau funcionamento dos bicos injetores, aumento da formação de depósitos de carbono e, conseqüente aumento das emissões.
Glicerol Total, Monoacilgliceróis, Diacilgliceróis e Triacilgliceróis	Valores acima da especificação indicam que o produto pode causar formação de depósitos nos injetores, levar a problemas de operação no motor em dias frios e provocar entupimento de filtros.	Mau funcionamento dos bicos injetores, aumento da formação de depósitos de carbono e, conseqüente aumento das emissões.

TABELA 2 – PARÂMETROS DE QUALIDADE PARA O BIODIESEL (continuação)

Parâmetro	Danos ao consumidor e aos motores	Danos ao Meio Ambiente
Metanol ou Etanol	Essa característica está diretamente relacionada ao ponto de fulgor, sendo indicativa de segurança no manuseio, armazenamento e transporte. O metanol presente no biodiesel é remanescente da reação de transesterificação.	O metanol é uma substância extremamente tóxica ao corpo humano.
Estabilidade à Oxidação a 110 °C	Indica o grau de oxidação do produto, bem como sua resistência em oxidar-se. Produtos resultantes da oxidação do biodiesel formam vários polímeros ácidos, que, por sua vez, causam depósitos no sistema, obstrução e falhas.	Mau funcionamento dos bicos injetores, aumento da formação de depósitos de carbono e, conseqüente aumento das emissões.

Dentre os parâmetros de qualidade citados, pode-se observar que dependendo do país, há a exigência de determinado parâmetro e em outro, não. Ou até mesmo o parâmetro ser exigido em diferentes países, mas com limites exigidos diferentes. A Tabela 3 apresenta um comparativo entre três especificações, a brasileira¹⁴, a americana, descrita na norma ASTM (American Society for Testing and Materials) D6751¹⁵, e européia¹³. Observando os dados da Tabela 3, verifica-se que a especificação brasileira é mais próxima da européia. Isso favorece possíveis exportações do biodiesel nacional. A especificação européia é a de referência mundial, visto que mercados asiáticos, africanos e sul-americanos a têm como base para suas especificações nacionais. Além disso, o biodiesel possui um maior tempo de uso na Europa, quando comparado aos outros continentes. Porém, a especificação americana também é relevante, haja vista o forte empenho da ASTM no aperfeiçoamento contínuo dos métodos de análise e nas próprias especificações, com intuito de satisfazer as necessidades do mercado americano, com suas peculiaridades de clima e logística. A especificação européia de certa forma limita a obtenção de biodiesel de matérias-primas diversificadas, de fato favorecendo a produção a partir de óleo de canola.

TABELA 3 – ESPECIFICAÇÕES DO BIODIESEL

Parâmetros	Brasil	E.U.A.	Europa
Aspecto	LII*	-	-
Massa Específica a 15 °C, kg/m ³	-	-	860-900
Massa Específica a 20 °C, kg/m ³	850-900	-	-
Viscosidade Cinemática a 40 °C, mm ² /s	3,0-6,0	1,9-6,0	3,5-5,0
Ponto de Fulgor, °C, mín.	100	93	101
Água, mg/kg, máx.	350/200**	-	500
Água e sedimentos, %vol., máx.	-	0,05	-
Contaminação Total, mg/kg, máx.	24	-	24
Cinzas Sulfatadas, %massa, máx.	0,02	0,02	0,02
Enxofre, mg/kg, máx.	10	15	10
Corrosividade ao Cobre (3h a 50 °C), máx.	1	-	1
Ponto de Entupimento de filtro a frio, °C, máx.	Regional	-	-
Número de Cetano, mín.	Anotar	47	51
Destilação a pressão reduzida, 90 % recuperados, °C, máx.	-	360	-
Resíduo de Carbono dos 10 % destilados, %massa, máx.	-	-	0,3
Resíduo de Carbono, % massa, máx.	0,05	0,05	-
Índice de Acidez, mgKOH/g, máx.	0,50	0,50	0,50
Índice de Iodo, g/100g, máx.	Anotar	-	120
Metanol e/ou Etanol***, %massa, máx.	0,20	0,20	0,20
Glicerol livre, %massa, máx.	0,02	0,02	0,02
Glicerol Total, %massa, máx.	0,25	0,24	0,25
Monoacilglicerol, %massa, máx.	0,80	-	0,80
Diacilglicerol, %massa, máx.	0,20	-	0,20
Triacilglicerol, %massa, máx.	0,20	-	0,20
Sódio + Potássio, mg/kg, máx.	5	5	5
Cálcio + Magnésio, mg/kg, máx.	5	5	5
Fósforo, mg/kg, máx.	10	10	4

TABELA 3 – ESPECIFICAÇÕES DO BIODIESEL (continuação)

Parâmetros	Brasil	E.U.A.	Europa
Estabilidade à Oxidação a 110 °C, h, mín.	6	3	6
Teor de éster, % massa, mín.	96,5	-	96,5
Éster metílico de ácido linolênico, % massa, máx.	-	-	12
Ésteres metílicos poliinsaturados, % massa, máx.	-	-	1

(*) Límpido e Isento de Impurezas.

(**) A especificação brasileira atual prevê o valor limite para teor de água de 350 mg/kg até 1º de janeiro de 2014, quando então o limite será reduzido para 200 mg/kg¹⁴.

(***) Apenas a especificação brasileira prevê a determinação de Etanol¹⁴.

Isso claramente é verificado nos parâmetros Índice de Iodo e Éster metílico de ácido linolênico, onde muitas matérias-primas não disponibilizariam um produto que atendesse a totalidade da especificação. Talvez esse fato aponte para uma política de interesses de determinado segmento de agricultores europeus, além de possível medida protecionista, pois determinados mercados (asiático e sul-americano, por exemplo) poderiam exportar para a Europa biodiesel a preço competitivo, aproveitando a diversidade de matérias-primas disponíveis.

3.1.3 Histórico do biodiesel no Brasil

Em 02 de julho de 2003, a Presidência da República instituiu por meio de Decreto um Grupo de Trabalho Interministerial encarregado de apresentar estudos sobre a viabilidade de utilização de biodiesel como fonte alternativa de energia. O resultado foi um relatório que deu embasamento para o estabelecimento do PNPB (Programa Nacional de Produção de Biodiesel) como ação estratégica e prioritária para o Brasil. Também por meio de Decreto, o PNPB foi instituído em 23 de dezembro de 2003. A estrutura gestora do Programa ficou definida com a instituição da Comissão Executiva Interministerial, possuindo, como unidade executiva, um Grupo Gestor. Foi aprovado pela CEIB (Comissão Executiva Interministerial de Biodiesel), em 31

de março de 2004, o plano de trabalho que norteava as ações do PNPB. No decorrer de 2004 as ações desenvolvidas permitiriam cumprir uma etapa fundamental para o PNPB que culminou com o lançamento oficial pela Presidência da República em 06 de dezembro de 2004. Na oportunidade houve o lançamento do Marco Regulatório que estabelece as condições legais para a introdução do biodiesel na Matriz Energética Brasileira de combustíveis líquidos³⁷⁻³⁸.

O biodiesel foi oficialmente introduzido na matriz energética do Brasil através da Lei nº 11.097 de 2005³⁷, sendo fixado o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. Nessa lei, foi concedido ainda um prazo de oito anos para a efetiva aplicação desse percentual mínimo. Porém, tal percentual já é praticado desde 1º de janeiro de 2010¹⁸, devido à capacidade produtiva do país já satisfazer o volume necessário para a prática do percentual de 5 %. A lei citada também atribuiu à ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) a incumbência de se regular o mercado do biodiesel, assim como de qualquer biocombustível. A regulação prevista na lei inclui: a implementação da política energética nacional; a fiscalização das atividades integrantes da indústria do biodiesel; o cumprimento das boas práticas de conservação e uso racional do biodiesel; a autorização de atividades relacionadas à produção, importação, exportação, armazenagem, estocagem, distribuição, revenda e comercialização de biodiesel; a especificação da qualidade e a organização e manutenção das informações e dados técnicos relativos às atividades reguladas³⁸.

Quando do lançamento do PNPB, as perspectivas eram animadoras devido ao potencial da exploração de matérias-primas que o país apresentava, observado nos dados levantados até então. Muito foi especulado da produção de biodiesel a partir de óleo de mamona, devido ao potencial de produção que particularmente as regiões Norte / Nordeste apresentaram; tais regiões também poderiam produzir grandes quantidades de Palma e Babaçu, disponíveis para a obtenção de biodiesel (regionalização). Além disso, eram claros os princípios do Marco Regulatório que privilegiavam políticas de inclusão social, como o “selo social”, no qual o produtor poderia ter acesso a incentivos fiscais desde que comprovasse que obtinha um percentual mínimo de matéria-prima

proveniente de agricultores familiares³⁹, e também de facilidades de Financiamentos⁴⁰. A Figura 4 apresenta um mapa que evidencia a intenção do governo brasileiro, de na época, explorar ao máximo as características produtivas de cada região³⁸. Com o intuito de se estabelecer um controle maior do mercado, a aquisição de biodiesel começou a ser feita exclusivamente na forma de leilões, promovidos pela ANP⁴¹.

Figura 4 – Mapa evidenciando a estratégia inicial do governo de explorar o potencial de matéria-prima para produção de biodiesel por região.

A Figura 5 apresenta um esquema de como funciona a cadeia do biodiesel no Brasil. Na prática, o biodiesel produzido é de responsabilidade do próprio produtor e este deve garantir que o produto atenda todas as exigências da especificação (produto certificado). Após produzido e certificado, o transporte do produto é de responsabilidade da adquirente do biodiesel no leilão da ANP. O produto é então armazenado, muitas vezes misturado com

biodiesel de outra procedência, até ser adicionado ao óleo diesel de origem fóssil na proporção estabelecida e disponibilizado ao posto revendedor, ou ao grande consumidor (hospitais, centrais elétricas, indústrias ou frotas cativas de transporte).

Até fins de 2005, havia apenas oito produtores de biodiesel autorizados pela ANP, totalizando uma capacidade de produção nominal de 85.320 m³ por ano⁴². No fim de 2011, foram registrados sessenta e nove produtores autorizados, totalizando uma capacidade de produção nominal de 6.770.900 m³ por ano. Porém, apenas aproximadamente 40 % dessa capacidade foi de fato produzida em 2011, indicando que existe uma capacidade ociosa de produção por parte das usinas. A Figura 6 apresenta gráfico que ilustra a evolução da capacidade de produção de biodiesel no país de 2005 a 2013⁴³.

Figura 5 – Cadeia de produção e distribuição de biodiesel no Brasil.

Já a Figura 7 apresenta mapa da estrutura da produção de biodiesel no Brasil no fim de 2011. Observa-se que muitas usinas produtoras encontram-se distribuídas na região Centro-Oeste, isso devido ao grane celeiro de produção de soja que a região apresenta. A localização dos produtores está relacionada justamente com a facilidade de obtenção da matéria-prima, e a

representatividade dessa matéria-prima para a produção de biodiesel. A Figura 8 apresenta gráfico que apresenta a evolução da participação de cada matéria-prima na obtenção de biodiesel⁴³. Verifica-se que a soja é a matéria-prima consideravelmente mais representativa do mercado de biodiesel brasileiro, e também pode-se notar que a diversidade de matérias-primas prevista no início do PNPB não foi alcançada.

Figura 6 – Evolução da capacidade de produção de biodiesel no Brasil.

Figura 7 – Infraestrutura da produção de Biodiesel no Brasil – 2011.

Figura 8 – Evolução das matérias primas utilizadas para a produção de biodiesel.

A Figura 9 apresenta foto de uma planta produtora de biodiesel autorizada pela ANP, no município de Veranópolis/RS.

Figura 9 – Planta de usina produtora de biodiesel.

A segunda matéria-prima em representatividade, segundo dados do gráfico da Figura 8 é a gordura animal (no caso, sebo bovino). Tal matéria-prima começou a ganhar destaque em 2008, devido principalmente ao preço, pois o óleo de soja é considerado uma *commodity* internacional, e que na segunda metade da última década apresentou elevações de preço, o que

desfavorece o seu uso na produção de biodiesel. Uma maior participação da gordura animal é complexa, devido ao problema do biodiesel gerado pelo sebo, que apresenta cadeias com maior grau de saturação (Tabela 1) e, conseqüentemente, problemas de congelamento em temperaturas menores que 15 °C⁴⁴.

Considerando o que já foi abordado quanto à especificação e características do biodiesel, alguns imprevistos na implantação do PNPB nos últimos anos foram detectados, apesar do aumento do percentual da mistura com óleo diesel (de 0 % a 5 % em aproximadamente quatro anos). Dentre esses imprevistos, destacam-se os seguintes:

- a) Inviabilidade da produção do biodiesel a partir de óleo de mamona. Uma das grandes apostas do PNPB, era o uso do óleo de mamona, principalmente na Região Nordeste, onde o solo é favorável para esta cultura por parte de pequenos agricultores. Porém, a composição majoritária deste biodiesel é de éster ricinoléico, que contém um radical hidroxila em sua cadeia (Figura 10). Esse radical confere uma massa específica média acima de 900 kg/m³ e uma viscosidade média acima de 12 cSt, portanto não atendendo as especificações internacionais (Tabela 3).
- b) Problemas logísticos e de qualidade acerca do biodiesel produzido. Tais problemas, que passam por congelamento de produto obtido a partir de gordura animal nas bases de distribuição, teores de água acima do especificado gerando proliferação de microrganismos e massas insolúveis nos tanques e bombas de abastecimento, levaram os agentes econômicos, juntamente com a ANP, a reverem práticas de manuseio e armazenamento do biodiesel, resultando em uma norma técnica de boas práticas⁴⁵ e em uma cartilha por parte da ANP⁴⁶. Tais problemas também foram vivenciados na Europa e nos Estados Unidos⁴⁷⁻⁴⁹.
- c) A inserção compulsória do óleo diesel de baixo teor de enxofre na matriz energética nacional. Devido a questões ambientais e de tendência mundial, o óleo diesel brasileiro nos últimos anos vem sofrendo mudanças rígidas na sua especificação quanto ao teor de enxofre⁵⁰. Os processos de refino para a obtenção do óleo diesel que

atenda esses novos limites de especificação resultam no chamado óleo diesel S10 (teor máximo de enxofre de 10 mg/kg), que possui uma grande sensibilidade ao teor de água presente no biodiesel, tolerando no máximo um teor de água de 200 mg/kg⁵¹. Isso em tese obriga o mercado de biodiesel a fazer investimentos ainda mais significativos no processo, a fim de produzir um biodiesel com teores de água ainda mais baixos que aqueles até então praticados.

- d) A praticamente exclusividade do uso do óleo de soja, aliados aos investimentos contínuos necessários à produção do biodiesel com parâmetros de qualidade exigentes levaram o biodiesel a ser produzido, em sua maior parte, por grandes empresas exportadoras de produtos oriundos da soja, com grande capacidade de investimento. Tal observação vai de encontro a um dos objetivos iniciais do PNPB, que previa parcela significativa do plantio das matérias-primas sendo realizado por pequenos agricultores, favorecendo projetos de inclusão social.
- e) A produção científica visando à disponibilização de matérias-primas de fato vantajosas economicamente, e que não tenham utilidade alimentar, tem sido um desafio acadêmico, sem de fato em seis anos ter levado a uma contribuição significativa para o mercado. O uso de matérias-primas diferentes da soja e sebo bovino tem esbarrado na competição alimentar (casos de palma e girassol), que apresentam preços mais vantajosos para tal fim que para a indústria do biodiesel, ou no não atendimento às especificações (casos de pinhão e óleo de fritura usado), ou mesmo nas baixas produtividades (casos de uma gama de variedade de oleaginosas)⁵². Esse cenário não tem permitido o uso de uma grande variedade de matérias-primas, como previsto pelo PNPB inicialmente.
- f) O uso do etanol, que estava previsto como uma das possíveis peculiaridades que o mercado brasileiro apresentaria, não foi de fato implementado, devido à pouca disponibilização do produto no mercado e ao preço. Para os produtores, ainda é mais vantajosa a importação do metanol que o uso do etanol para a produção de

biodiesel. Dos 69 produtores autorizados pela ANP no fim de 2011, apenas 3 (4 %) afirmaram que utilizaram etanol em algum lote⁴³.

Figura 10 – Ricinoleato de metila, constituinte majoritário do biodiesel de mamona.

Diante dos problemas expostos, mesmo com o país contando com uma capacidade nominal de produção que permitiria até o uso obrigatório de uma mistura com até 12 % de biodiesel no óleo diesel de origem fóssil, as perspectivas para um aumento do teor da mistura soam como um desafio técnico para o país. O cenário atual tem convergido para o fim dos leilões da ANP, uma vez que o mercado já está estabelecido, e os agentes econômicos têm mostrado capacidade de negociar preços diretamente com os produtores, e estes têm evidenciado competência técnica e capacidade de investimentos para garantir o suprimento da demanda de biodiesel com a qualidade requerida. Talvez a mudança de rumos do PNPB, diferentes de alguns traçados originalmente, seja apropriada para o momento que o mercado de biodiesel brasileiro se encontra.

3.1.4 O processo de oxidação do biodiesel

O biodiesel é susceptível à oxidação quando exposto ao ar e o produto de sua oxidação, em última análise, afeta a qualidade do combustível. Em função disso, a estabilidade à oxidação tem sido objeto de inúmeras pesquisas²⁻¹¹. Um parâmetro de especificação para a estabilidade à oxidação foi incluído nas especificações europeias de biodiesel, EN (Europeenne Norme) 14213 e EN 14214¹²⁻¹³. O método utilizado para avaliar a estabilidade à oxidação emprega o equipamento Rancimat¹⁶. A Figura 11 apresenta fotografia do equipamento correspondente.

As razões para a oxidação do biodiesel estão relacionadas à presença de ligações duplas nas cadeias de várias substâncias graxas. A oxidação de substâncias graxas insaturadas procede a diferentes velocidades, dependendo do número e da posição das ligações duplas⁵³. As posições CH₂-alquílicas, em relação às duplas ligações presentes nas cadeias dos ácidos graxos, são aquelas efetivamente susceptíveis à oxidação. As posições bis-alílicas em ácidos graxos poliinsaturados de ocorrência natural, tais como os ácidos linoléico (duplas ligações em $\Delta 9$ e $\Delta 10$, gerando uma posição bis-alílica em C-11) e linolênico (duplas ligações em $\Delta 9$, $\Delta 12$ e $\Delta 15$, gerando duas posições bis-alílicas em C-11 e C-14) são ainda mais susceptíveis à oxidação que as posições meramente alílicas. As velocidades relativas de oxidação fornecidas na literatura⁵³ correspondem a 1 para oleatos (ésteres metílicos e etílicos), 41 para linoleatos, e 98 para linolenatos. Esta é uma propriedade essencial, porque a maioria dos diferentes tipos de biodiesel contém quantidades significativas dos ésteres dos ácidos graxos oléico, linoléico e linolênico que, por sua vez, podem influenciar a estabilidade oxidativa dos combustíveis. As espécies formadas durante o processo de oxidação causam a deterioração eventual do combustível. Pequenas quantidades de componentes graxos de maior grau de insaturação têm um efeito forte, porém, diferenciado, sobre os resultados de estabilidade à oxidação, obtidos por método IEO (Induced Electron Oxidation)¹⁰.

Inicialmente, hidroperóxidos são formados durante a oxidação, gerando aldeídos, ácidos e outros compostos oxigenados como produtos do processo de oxidação em cadeia⁵³. Entretanto, duplas ligações também podem ser orientadas a reações de polimerização que levam a produtos de maior massa molar e, eventualmente, a um aumento da viscosidade do combustível. Dentre tais produtos podem ser formadas espécies insolúveis no combustível, que poderão entupir linhas e bombas de combustível devido ao tamanho das partículas. Um estudo⁵⁴ demonstrou que os polímeros formados durante o armazenamento do biodiesel sob condições controladas são, devido à sua natureza polar, solúveis no biodiesel, e insolúveis em misturas de biodiesel com óleo diesel mineral, por este último ser basicamente constituído de hidrocarbonetos.

A questão da estabilidade à oxidação afeta a qualidade do biodiesel principalmente em decorrência de longos períodos de armazenamento. A influência de parâmetros, como a presença de ar, calor, traços de metais, antioxidantes e peróxidos, bem como a natureza do tanque de armazenamento, foram investigadas em vários estudos⁶⁻¹¹. Resumindo as descobertas até então obtidas, a presença de ar, luz, ou de metais bem como de temperaturas elevadas, facilitam o processo de oxidação. Estudos realizados com métodos IEO automatizados confirmam o efeito catalisador de metais sobre a oxidação; no entanto, a influência da estrutura dos ésteres graxos, especialmente o grau de insaturação, foi ainda mais importante¹⁰. Vários outros métodos, incluindo alguns de via úmida como o índice de acidez (IA), o índice de peróxidos (IP) – este pode ser substituído pelo Índice de Iodo, que é uma medição indireta do grau de insaturação do biodiesel – e a P-DSC (calorimetria diferencial de varredura sob pressão) têm sido aplicados em estudos de oxidação do biodiesel⁵⁵⁻⁵⁷.

Além do método Rancimat¹⁶ (método de referência) para a determinação da estabilidade oxidativa do biodiesel, foi desenvolvido nos últimos anos, no âmbito da ASTM, um método alternativo, com resultados diretamente proporcionais aos resultados do método de referência. Trata-se do RSSOT (Rapid Small Scale Oxidation Test)⁵⁸, que possibilita obter-se o resultado em minutos, não em horas. A própria especificação americana de biodiesel o considera apenas como alternativo¹⁵, e em caso de divergência, o resultado a ser considerado deve ser aquele obtido pelo método de referência.

Dentre as matérias-primas mais utilizadas para produção de biodiesel, nas quais o parâmetro de estabilidade à oxidação é mais crítico, pode-se citar soja, canola, milho, algodão e girassol com base nos dados da Tabela 1, tomando a composição significativa de cadeias carbônicas insaturadas destas matérias-primas⁵⁹. Considerando a grande importância da soja como matéria-prima do mercado brasileiro, pode-se concluir que a estabilidade à oxidação é um parâmetro crítico na qualidade do biodiesel brasileiro. Na Europa, onde a principal matéria-prima é a canola, além do parâmetro de estabilidade à oxidação a 110 °C, é especificado teor de éster linolênico (três insaturações na cadeia) e teor de ésteres poliinsaturados, além do Índice de Iodo. No Brasil, apenas o parâmetro de estabilidade à oxidação a 110 °C é especificado

(mínimo de seis horas), considerando diretamente a tendência do biodiesel em oxidar-se. O Índice de lodo deve ser apenas reportado, não tendo valor limite especificado (Tabela 3). Nos Estados Unidos, o limite de três horas mínimas no método Rancimat¹⁶ é adotado, considerado suficiente em estudos⁶⁰. A especificação Argentina, não exposta na Tabela 3, adota um mínimo de oito horas no método Rancimat. Cabe ressaltar que o biodiesel produzido na Argentina tem como principal destino a exportação⁶¹, logo, aquele país adota um limite mais rígido para sua especificação, prevendo grandes trajetos no transporte e longos períodos de armazenamento.

Figura 11 – Equipamento Rancimat.

O método Rancimat é baseado na medida de uma célula de condutividade. A amostra é submetida a 110 °C em um fluxo constante (10 L/h) de inserção de ar atmosférico, logo, uma oxidação é forçada. Após certo tempo, dependendo da amostra, ácidos leves resultantes da oxidação são liberados pela amostra e carregados pelo ar, sendo borbulhados em uma célula de condutividade com água ultrapura. A célula de condutividade fica ativa desde o início do ensaio, e assim que os produtos da oxidação são borbulhados, o aumento de condutividade é registrado, obtendo-se um gráfico

da condutividade pelo tempo. A Figura 12 mostra um exemplo de gráfico obtido no ensaio. O ponto de inflexão da curva – onde a segunda derivada é máxima – caracteriza o tempo em que a amostra é resistente à oxidação, e o resultado final do ensaio, em horas.

Figura 12 – Gráfico obtido no ensaio Rancimat de uma amostra de biodiesel. Em verde, a curva condutividade x tempo. Em azul, a segunda derivada da curva. Resultado do ensaio em 10,04 horas.

A estabilidade à oxidação também tem sido especificada nos limites americanos para B6-B20 (combustível composto de mistura de biodiesel com óleo diesel fóssil em proporção que pode variar de 6 a 20 % de biodiesel)⁶². Isso porque tem sido comprovado que mesmo em proporção menor na mistura, o biodiesel é responsável pela estabilidade à oxidação da mistura, por ser bem menos resistente à oxidação que o óleo diesel fóssil⁶⁰. Para a medição da Estabilidade à Oxidação da mistura B6 a B20, é adotado método Rancimat, porém com diferenças ao método original acerca da massa de amostra e do tubo utilizado⁶³.

3.2 Antioxidantes

3.2.1 Uso de antioxidantes em biodiesel

Óleos vegetais usualmente contêm antioxidantes de ocorrência natural como os tocoferóis. Portanto, óleos vegetais não refinados que ainda apresentem seus teores naturais de antioxidantes naturalmente apresentam estabilidade oxidativa superior em comparação com óleos refinados², mas não satisfazem a maioria das outras exigências para uso combustível. Antioxidantes naturais foram adicionados também ao biodiesel para avaliar os seus respectivos comportamentos sobre a oxidação. Além destes antioxidantes naturais, também existe uma variedade de antioxidantes sintéticos. Muitos deles são fenóis substituídos como o butil hidroxitolueno (BHT; 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol), butil hidroxianisol (BHA; 3-t-butil-4-hidroxianisol), tert-butil hidroquinona (TBHQ; 2-tert-butil-hidroquinona), pirogallol (1,2,3-trihidroxibenzeno) e propil galato (PG; éster propílico do ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico). Alguns estão ilustrados na Figura 13. Estes antioxidantes sintéticos também foram investigados em relação aos seus efeitos sobre a estabilidade do biodiesel^{11,64-65}.

Figura 13 – Alguns antioxidantes sintéticos.

A estrutura fenólica desses compostos permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação⁶⁶.

Esses antioxidantes são utilizados na indústria alimentícia, em óleos e gorduras, para prevenir oxidação lipídica. Esta é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos potencialmente tóxicos⁶⁷⁻⁶⁹.

Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais⁷⁰. Em outros estudos, o BHA mostrou induzir hiperplasia gastrintestinal em roedores por um mecanismo desconhecido; em humanos, a relevância dessa observação não está clara⁷¹. A redução do nível de hemoglobina e a hiperplasia de células basais foram atribuídas ao uso de TBHQ⁶⁸. Por estes motivos, o uso destes antioxidantes em alimentos é limitado; TBHQ não é permitido no Canadá e na Comunidade Européia¹⁹. No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita 200 mg/kg para BHA e TBHQ e 100 mg/kg para BHT como concentrações máximas permitidas¹⁹.

Para o atendimento às especificações (Tabela 3), o óleo vegetal utilizado como matéria-prima do biodiesel é quase sempre refinado. Esse processo retira quase que a totalidade dos antioxidantes naturais do óleo. Aliado ao processo de transesterificação, para obtenção do biodiesel, praticamente todo o teor de antioxidantes naturais é removido, sendo praticamente obrigatória a adição de antioxidantes sintéticos, quando o biodiesel é obtido a partir de óleo de soja, girassol, algodão, canola ou matéria-prima com grau de insaturação semelhante⁷². Quando o biodiesel é obtido a partir de matéria-prima com menor grau de insaturação (gordura animal, óleo de palma), tem-se dispensado o uso de antioxidantes sintéticos, visto que costumam atender as especificações no

momento da retirada da usina produtora pelo distribuidor. Porém, não se encontram na literatura estudos sobre o comportamento do biodiesel deste tipo após longos períodos de armazenamento. Apenas existem estudos que apontam que esse tipo de biodiesel, embora apresente melhor estabilidade, ou seja, maior resistência à oxidação, por outro lado tem apresentado problemas de formação de massas insolúveis, devido à solidificação em baixas temperaturas e presença de contaminantes saturados, mais especificamente monoacilgliceróis saturados⁷³⁻⁷⁵.

Diferentes antioxidantes sintéticos têm diferentes efeitos sobre o biodiesel, dependendo do tipo de matéria-prima⁶³, sem causar alterações em propriedades, como viscosidade, ponto de entupimento de filtro a frio, densidade, dentre outros. Em outro estudo, diferentes antioxidantes apresentaram pouco ou nenhum efeito quando investigados pelo método AOM (Accelerated Oxidation Method)⁶. O TBHQ, particularmente, tem sido apontado por vários estudos como o de melhor desempenho para biodiesel. Ferrari aponta o TBHQ como de melhor desempenho em biodiesel de girassol, após avaliação pelo método Rancimat e também por absorção espectrofotométrica de compostos resultantes da oxidação (Figura 14)⁷⁶. Cavalcanti, também pelo método Rancimat, avaliou o desempenho de misturas de antioxidantes, nas quais encontrou o melhor tempo de resistência à oxidação em misturas com maior teor de TBHQ⁷⁷; Dinkov avaliou vários parâmetros que são alterados quando da oxidação do biodiesel (viscosidade, densidade, acidez, etc.) e o efeito quando da adição dos antioxidantes, contribuindo inclusive para a diminuição de material particulado quando da queima de misturas Bx (óleo diesel mineral com x % de biodiesel, em volume)⁷⁸. Mittelbach também acusou o melhor desempenho do TBHQ, comparando-o inclusive com antioxidantes naturais⁷⁹. Borsato, através de estudo físico-químico (com auxílio de diagramas de nível) também encontrou o melhor desempenho para TBHQ, comparando-o com BHT e BHA (Figura 15)⁸⁰. Hess levantou a possibilidade de que o uso de antioxidantes sintéticos poderiam vir a diminuir as emissões do tipo NO_x, emissões essas que o biodiesel apresenta em maior grau que o óleo diesel mineral (apesar que nas emissões de CO₂, hidrocarbonetos, material particulado e óxidos de enxofre o óleo diesel mineral apresente um grau consideravelmente maior que o biodiesel)⁸¹.

Figura 14 – Gráfico obtido em estudo por espectrofotometria UV (Ultravioleta) - Visível que monitorava absortividades molares de compostos resultantes de oxidação de biodiesel de óleo de girassol, após adição de antioxidantes sintéticos.

Figura 15 – Curvas de nível utilizadas para demonstrar graficamente a eficiência do TBHQ para a manutenção da estabilidade do biodiesel em relação ao BHA e ao BHT. O diagrama da esquerda foi obtido após 7 dias de experimento e o da direita, após 15 dias.

Devido ao grande uso dos antioxidantes sintéticos, consequência da grande participação da soja para o biodiesel brasileiro⁴³, os estudos de estabilidade em função de variáveis no armazenamento têm aumentado, assim como de desempenho dos antioxidantes sintéticos. Sendo assim, é de grande utilidade que existam metodologias analíticas confiáveis que determinem teores de antioxidantes sintéticos após a produção de biodiesel. Com estas metodologias, facilmente pode-se avaliar a concentração de um determinado antioxidante sintético em função do tempo de armazenamento do produto, e não somente monitorando-se produtos de oxidação do biodiesel. É possível também relacionar dados de concentrações de antioxidantes em função da estabilidade do produto em um dado momento; Adicionalmente, torna-se viável analisar indiretamente a degradação do antioxidante através de sua concentração ao longo do tempo.

Como mencionado anteriormente, existem níveis máximos tolerados destas substâncias para consumo humano, e conseqüentemente, o uso por parte de uma indústria não-alimentícia não gera maiores preocupações acerca do controle desses compostos especificamente. Como exemplo, a indústria de biodiesel utiliza esses produtos com o intuito de adequar o produto à especificação, logo, quando o combustível atende os valores especificados, a concentração utilizada desses compostos tem uma importância secundária, e tal fato pode gerar impacto ambiental. Tal impacto vem de uma contaminação do solo, possível porque vazamentos de produto em pequenas quantidades não são tidos como perigosos, pois trata-se de um biocombustível. Considerando que a maior parte das usinas produtoras se concentra em áreas rurais, de plantio de alimentos, teoricamente pode haver problemas de contaminações de cultivos, além de problemas para a fauna. Considerando também que as unidades de distribuição de combustível (onde biodiesel é armazenado) são em geral próximas às grandes cidades, contaminação de rede de águas também pode ser cogitada.

3.2.2 Metodologias desenvolvidas para determinação de antioxidantes sintéticos em biodiesel

Os métodos para quantificação de antioxidantes sintéticos em óleos vegetais foram desenvolvidos com o propósito de se monitorar a concentração com vistas à toxicidade elevada desses compostos¹⁹. Logo, o primeiro método disponível na literatura para quantificação dessas substâncias em biodiesel tomou por base método usado em óleos vegetais⁸²⁻⁸³, que consiste na utilização de CLAE-UV (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de Ultravioleta). A Figura 16 ilustra cromatogramas obtidos por este método⁸⁴.

Figura 16 – Cromatograma ilustrado em Tagliabue et al, evidenciando a eficiente separação dos antioxidantes sintéticos em biodiesel. (1) Pirogalol; (2) Pirocatecol; (3) Propil galato; (4) TBHQ; (5) BHT; (6) Ascorbil palmitato.

Como os estudos disponíveis têm apontado o TBHQ como aquele antioxidante de melhor desempenho no biodiesel, os métodos desenvolvidos

mais recentemente foram desenvolvidos somente para TBHQ, fazendo-se uso de técnicas eletroquímicas, aproveitando-se da natureza do TBHQ, que facilmente pode ser oxidado a quinona e por consequência gerando um sinal de corrente quando um potencial é aplicado (Figura 17). Araújo utilizou voltametria de varredura linear em eletrodo de pasta de carbono, com auxílio de surfactante (Figuras 18 a 20)⁸⁵.

Figura 17 – Reação de oxidação de hidroquinona para quinona. Com o TBHQ (Figura 13), ocorre reação semelhante quando um potencial é aplicado.

Figura 18 – Voltamogramas cíclicos evidenciando que o uso de surfactante melhora o sinal eletroquímico para determinação. (a) meio tamponado em pH 6,52; (b) TBHQ na ausência e (c) na presença de surfactante CTAB (Cetyltrimethyammonium bromide); (d) CTAB sem TBHQ.

Figura 19 – Voltamogramas evidenciando que o CTAB é o surfactante que melhor potencializa o sinal de oxidação do TBHQ. (a) meio tamponado em pH 6,52; (b) TBHQ na

ausência e (c) na presença de surfactante; (d) surfactante sem TBHQ. Da esquerda para direita: CTAB, Triton-100 e Lauril.

Figura 20 – Voltamogramas, para adição-padrão na quantificação de TBHQ em biodiesel, com o uso de surfactante CTAB. Todos os métodos eletroquímicos propostos seguem esta tática de quantificação.

Tormin propôs metodologia amperométrica direta, sem o uso de surfactante, apenas selecionando eletrólito suporte mais ácido, usando

eletrodo de carbono vítreo não-modificado e amperometria de pulso múltiplo (Figura 21)⁸⁶.

Figura 21 – Voltamograma com potencial selecionado para aplicar a quantificação.

Araújo também testou o uso de voltametria de onda quadrada, com bons resultados⁸⁷. Tormin também desenvolveu método utilizando amperometria de com análise de injeção pontual, porém com de detecção simultânea para TBHQ e BHA⁸⁸. Caramit recentemente também desenvolveu método voltamétrico de detecção simultânea de TBHQ e BHA em biodiesel, usando eletrodos de nanotubos de carbono multicamadas modificado⁸⁹.

Todas essas metodologias propostas utilizaram o método CLAE-UV como referência, e em geral apresentaram valores de recuperação muito próximos, e ligeiramente melhores em alguns casos. Assim sendo, tem-se mostrado que o método que utiliza CLAE-UV, bem similar aos métodos disponíveis para determinação desses compostos em óleos vegetais, pode ser satisfatoriamente substituído por outras técnicas. As técnicas eletroquímicas demonstraram ter grande potencial para determinação de TBHQ, porém ainda não foram testadas para outros antioxidantes sintéticos, como foi a metodologia por CLAE-UV. Existe método que utiliza cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama⁹⁰, porém foi desenvolvido para aplicação em óleos vegetais e

não biodiesel. Nesse método é realizada uma extração seguida de reação de metilação, substituindo os grupos (-OH) por radicais metila. A extração é realizada pelo fato de que constituintes do óleo poderiam interferir na reação de metilação dos antioxidantes sintéticos. Já a reação de metilação (no caso, procedida com hidróxido de tetrametilamônio) foi escolhida pelo autor para a retirada dos grupos (-OH), que podem causar forte interação entre os analitos e a fase estacionária da coluna, comprometendo o formato dos picos no cromatograma e, conseqüentemente, a quantificação. A análise cromatográfica foi realizada com coluna de fase estacionária polar, e injeção *splitless*. A Figura 22 ilustra cromatogramas obtidos com tal método⁹⁰.

Figura 22 – Cromatogramas obtidos por cromatografia em fase gasosa em método para aplicação em óleos vegetais. 1 – BHA; 2 – BHT; 3 – TBHQ; 4 – N-tetradecanol (solvente dos padrões utilizados). Padrões puros (A) e após extração no óleo vegetal e metilação com hidróxido de tetrametilamônio (B).

3.3. Cromatografia em Fase Gasosa

3.3.1 Generalidades

A Cromatografia Gasosa é um procedimento físico utilizado para separar-se uma amostra em seus componentes individuais. A base para esta separação é a distribuição da amostra entre duas fases – uma fase estacionária e uma fase gasosa móvel.

A fase móvel é denominada de gás de arraste ou gás portador, uma vez que trata-se de um gás inerte cuja finalidade é transportar as moléculas a serem separadas, através da coluna.

De acordo com a natureza da fase estacionária, é possível dividir-se, para fins didáticos, a cromatografia gasosa em: cromatografia gás-líquido (C.G.L) e cromatografia gás-sólido (C.G.S).

No caso da cromatografia gás-sólido, C.G.S., a fase estacionária é um sólido de grande área superficial, usualmente um adsorvente como carvão vegetal, sílica-gel, ou peneira molecular (zeólita sintética). A adsorção diferencial dos componentes da mistura a ser separada sobre a superfície sólida é a base para a separação cromatográfica na C.G.S. a qual é, geralmente, empregada na separação de gases como nitrogênio, oxigênio, monóxido de carbono e outros.

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

A fase estacionária encontra-se acondicionada, através da qual o gás de arraste flui continuamente. As moléculas da amostra irão distribuir-se ao equilibrar-se entre o gás de arraste e a fase líquida. As espécies mais solúveis na fase líquida permanecerão menos tempo no gás de arraste em movimento e, como consequência, irão deslocar-se mais lentamente através da coluna.

Uma fase líquida que apresente solubilidade seletiva para dois dados compostos, estes poderão ser separados por cromatografia gás-líquido, devido à diferença de solubilidade na fase líquida.

A figura 23 mostra o cromatograma correspondente à separação de dois compostos por C.G.L. O componente A, menos retido, deixa a coluna em tempo inferior ao B (mais retido). Após a separação, A e B podem ser identificados e/ou quantificados.

Devido à grande diversidade de fases líquidas disponíveis, a cromatografia gás-líquido torna-se a mais versátil e seletiva forma de cromatografia em fase gasosa. Isto permite que sejam analisadas amostras sólidas, líquidas ou gasosas desde que sejam voláteis ou possam vir a ser volatilizadas de diferentes formas.

Figura 23 – Cromatograma típico obtido por separação dos componentes A e B por Cromatografia em Fase Gasosa.

Desta forma, é preferível a denominação cromatografia em fase gasosa uma vez que o processo cromatográfico ocorre em fase gasosa, independente do estado físico inicial da amostra⁹¹.

3.3.2 Instrumentação

A Figura 24 apresenta os componentes básicos de um sistema cromatográfico. A seguir cada um dos componentes é descrito.

Gás de Arraste

A função do gás de arraste, ilustrado na Figura 24 no reservatório de gás, é “arrastar” a amostra através da coluna, ou seja, agir como a fase móvel. Deve ser inerte e não pode interagir quimicamente com a amostra. Sua segunda função é prover uma matriz adequada para o detector diferenciar os componentes da amostra⁹¹.

Injetor

A obtenção de picos ideais em cromatografia gasosa é altamente dependente da forma de introduzir-se a amostra na coluna (injeção). Quando do uso de colunas capilares, a injeção precisa ser realizada rapidamente e a quantidade de amostra deve ser muito pequena, geralmente, menor que 1 µg. em uma coluna capilar típica de 25 m, há cerca de 10 mg de fase líquida. Isso mostra que se forem injetadas grandes quantidades de amostra, a coluna pode ser entupida, ou ocorrer vazamentos⁹¹. Picos provenientes de colunas capilares são muito estreitos, havendo larguras de poucos segundos, por isso, injeções rápidas são necessárias, a fim de minimizar o alargamento de banda produzido por uma injeção lenta⁹¹.

Coluna

A coluna é onde, de fato, ocorre o processo cromatográfico, uma vez que é nela que a separação irá ocorrer. A escolha da coluna apropriada para uma dada separação é de suma importância, e muitas vezes, difícil.

Entre os diferentes parâmetros a serem considerados quando da escolha da coluna, dois devem ser destacados: a fase estacionária (o suporte sólido e a fase líquida) e o tubo onde será acondicionado (material, dimensões, etc.). Dentre os materiais mais utilizados, destaca-se sílica com poliamida, o que permite a obtenção de colunas de grande extensão compactadas em um volume pequeno.

Colunas capilares de sílica fundida são feitas de sílica purificada especialmente que contém quantidades mínimas de óxidos metálicos. Esses capilares têm paredes mais finas que as antigas colunas equivalentes em vidro. Os tubos ganham resistência com recobrimentos protetores de poliamidas, que são aplicados conforme os tubos capilares estão sendo produzidos. As colunas resultantes são bastante flexíveis e podem ser enroladas como bobinas com diâmetros de alguns centímetros. Colunas capilares estão disponíveis comercialmente e oferecem várias vantagens importantes, como resistência física, reatividade muito mais baixa com relação aos componentes da amostra e flexibilidade. Para a maioria das aplicações, elas substituíram as colunas de vidro antigas.

Figura 24 – Componentes básicos de um sistema cromatográfico.

Forno

É desejável que a temperatura da coluna seja suficiente para que o tempo de análise seja curto, porém suficientemente baixa para que a eficiência desejada seja atingida. Em geral, o tempo de retenção duplica a cada 30 °C diminuindo na temperatura da coluna (controlada pelo forno).

Para a grande maioria das amostras, quanto menor a temperatura da coluna, maior será a razão dos coeficientes de partição na fase estacionário e, como consequência, uma melhor separação será atingida. Deve ser lembrado, entretanto, que em alguns casos não se obtém separação alguma com a coluna operando a baixas temperaturas⁹¹. Em geral, a fase estacionária líquida da coluna apresenta limites de temperatura que devem ser observados (cerca de 350 °C para as fases mais resistentes), pois além desses limites pode haver alteração nas propriedades da fase estacionária. Entretanto, o uso recente de colunas de alta temperatura (HT – High Temperature column) tem possibilitado a análise, por cromatografia gasosa, de uma série de compostos de peso molecular alto, até então não analisáveis por esta técnica, chegando-se a até 450 °C em algumas análises⁹².

Detector

O detector ideal para cromatografia gasosa tem as seguintes características⁹³:

- a) Sensibilidade adequada. O que exatamente significa sensibilidade adequada não pode ser descrito em termos quantitativos. Por exemplo, descrições de sensibilidades dos detectores diferem de um fator de 10^7 . Apesar disso, todos são amplamente usados e claramente adequados para determinadas tarefas. Os menos sensíveis não são, entretanto, satisfatórios para certas aplicações. Em geral, as sensibilidades dos detectores atuais estão dentro de um intervalo de 10^{-8} a 10^{-15} g de soluto por segundo.
- b) Boa estabilidade e reprodutibilidade.

- c) Uma resposta linear para solutos que se estenda por várias ordens de grandeza.
- d) Um intervalo de temperatura que abranja desde a temperatura ambiente até, pelo menos, 400 °C.
- e) Uma resposta rápida, independente da vazão.
- f) Alta confiabilidade e de fácil uso. O detector deve, na medida do possível, funcionar bem, mesmo nas mãos de operadores inexperientes.
- g) Similaridade na resposta para todos os solutos ou alternativamente uma resposta altamente previsível e seletiva para uma ou mais classes de solutos.
- h) Não destruir a amostra.

De fato, nenhum detector apresenta todas essas características e parece pouco provável que tal detector venha a ser obtido⁹³.

Os tipos de detectores mais comuns são: detector de ionização por chama, de condutividade térmica, de quimioluminescência de enxofre, de captura de elétrons, de emissão atômica, termoiônico. Há ainda o uso importante de detectores como espectrômetro de massa e o espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier. Mesmo com essa diversidade de detectores, mais de 90 % dos cromatógrafos a gás em operação no mundo são equipados com detector de condutividade térmica, ionização por chama ou captura de elétrons⁹¹. A Figura 25 apresenta um esquema básico de um detector de ionização por chama.

Figura 25 – Esquema básico de um detector de ionização por chama. Neste caso, Ocorre a queima de hidrogênio pelo oxigênio presente no ar sintético, que gera uma chama. Compostos orgânicos oriundos da coluna geram íons após a combustão, que são coletados pelo eletrodo que se encontra polarizado devido à uma diferença de potencial aplicada. O fluxo desses íons gera uma corrente, proporcional à quantidade daquele composto orgânico.

Registrador

A função do registrador é imprimir, geralmente na forma de uma gaussiana, o sinal elétrico proveniente do detector, o qual deverá ser proporcional à quantidade de amostra injetada no sistema cromatográfico. Desta forma, o cromatograma obtido no registrador permitirá uma análise qualitativa e / ou quantitativa da amostra em estudo.

O aparecimento dos integradores eletrônicos modernos na década de 70 fez com que os registradores potenciométricos comesçassem a perder terreno para o registro de cromatogramas. Os integradores além de representarem o cromatograma, permitem ainda o registro dos tempos de retenção, altura do pico e área dos picos. A partir destes dados, torna-se fácil o cálculo de concentrações e áreas relativas.

Na década de 80, surgiram novas opções para o registro de dados através do uso de computadores pessoais. Uma interface A/D (analógica-

digital) permite a conversão do sinal analógico do detector para digital, linguagem própria para o computador. Isto permite a aquisição dos dados cromatográficos diretamente pelo computador, sem necessidade de uso de integradores. Adicionalmente, uma interface D/A (digital/analógica), permite ao computador o controle de todas as funções do cromatógrafo, transformando o computador em uma ferramenta muito mais versátil do que o registrador ou integrador⁹¹.

3.3.3 Métodos de derivatização

O termo derivatização, refere-se, em cromatografia, à transformação de um composto químico em outro, de fácil volatilização, com o intuito de obter-se uma análise mais rápida, conveniente ou mais exata, evitando retenções na coluna. Esta melhora pode ser obtida tanto na etapa de preparo da amostra quanto na de análise. O novo composto formado geralmente apresenta uma ou mais das seguintes vantagens em relação ao composto de partida; mais fácil de ser extraído ou cromatografado; medido com maior sensibilidade ou exatidão; ou mais facilmente separado de interferentes.

Uma das maiores (se não a maior) limitações da cromatografia gasosa pode ser contornada através da derivatização; a elevada polaridade, baixa volatilidade e/ou estabilidade térmica de vários compostos orgânicos, particularmente biomoléculas. Assim, muitas moléculas excluídas da análise por cromatografia gasosa quando no estado “livre” podem ser adequadamente analisadas na forma de um derivado. Compostos contendo massa molecular elevada e grupos polifuncionais não, são, usualmente, adequados à análise direta por cromatografia gasosa. Em geral, estes grupos funcionais tornam o composto bastante polar e reduzem sua volatilidade tornando o tempo de retenção demasiadamente longo. Em casos extremos, não há eluição da coluna cromatográfica. Felizmente, tais compostos podem ser facilmente convertidos a derivados menos polares e mais adequados à análise por cromatografia gasosa. Grupos carboxila (COOH) e hidroxila (OH) causam

maiores problemas sendo seguidos pelos grupos amino (NH_2) e imino ($=\text{NH}$), os quais devem ser derivatizados para uma análise mais adequada⁸⁹.

Dentro os métodos de derivatização, um bom exemplo é a *sililação*, ou *silanização*, que é a produção de derivados do trimetilsilil, mais especificamente a trimetilsililação (com grupo TMS, trimetilsilil), processo conhecido há várias décadas⁹², e trata-se de uma substituição dos prótons lábeis em compostos polares pelo grupo trimetilsilil $[-\text{Si}(\text{CH}_3)_3]$. Vários grupos funcionais podem ser derivatizados dessa forma, incluindo os seguintes grupos:

Dentre as classes de compostos que podem ser derivatizados por esta técnica destacam-se alcoóis, ácidos carboxílicos, aminas, fenóis, carboidratos, esteróides, e muitos outros. Existem ainda vários outros métodos de derivatização, como acetilação e esterificação⁹¹.

3.3.4 Cromatografia Gasosa e o Biodiesel

Como mostra a Tabela 3, percebe-se que muitos são os parâmetros de qualidade exigidos para o biodiesel. A técnica de cromatografia em fase gasosa é uma ferramenta fundamental no controle de qualidade do biodiesel, pois dos 31 parâmetros listados, 9 utilizam a cromatografia gasosa como técnica nos métodos de referência. Isso corresponde a 29 % de todos os parâmetros de controle de qualidade do biodiesel. A tabela 4 apresenta um resumo dos métodos de cromatografia gasosa, atualmente utilizados no controle de qualidade de biodiesel, destacando suas aplicações.

TABELA 4 – MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA GASOSA EM ANÁLISES DE BIODIESEL

Método	Parâmetro de qualidade aplicável	Resumo
EN14103 ⁹⁴	Teor de éster	Utiliza coluna de fase estacionária polar, e o biodiesel é injetado diluído em tolueno, juntamente com um padrão interno. Identifica todos os picos da amostra relativos a ésteres, quantificando o teor total de ésteres e de éster linolênico (C18:3) na amostra. Detector de ionização por chama.
	Teor de éster linolênico	
EN14110 ⁹⁵	Teor de Metanol	Utiliza-se injeção com <i>headspace</i> , que consiste no aquecimento da amostra e a injeção apenas dos vapores liberados. O resultado é um cromatograma limpo, apenas com o pico relativo ao metanol. Detector de ionização por chama.
NBR 15764 ⁹⁶	Teor de éster	Utiliza coluna de fase estacionária apolar, e o biodiesel é injetado diluído em heptano. Identifica os picos da amostra de ésteres, quantificando o total de ésteres por meio de calibração externa. Detector de ionização por chama.
NBR 15343 ⁹⁷	Teor de metanol e/ou etanol	Utiliza coluna de fase estacionária apolar, e o biodiesel é injetado puro, fortificado com padrão interno. Identifica os picos de metanol e/ou etanol, quantificando essas substâncias. Detector de ionização por chama.
EN14105 ⁹⁸	Teor de glicerol livre, glicerol total, mono-, di- e triacilgliceróis	Utiliza coluna de fase estacionária apolar de alta temperatura, e o biodiesel é injetado diluído em heptano. Antes, porém, possui etapa de derivatização devido à natureza dos gliceróis. A quantificação é feita por curva analítica com padronização interna. Detector de ionização por chama.
ASTM D6584 ⁹⁹		
NBR 15908 ¹⁰⁰		

TABELA 4 – MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA GASOSA EM CONTROLE DE QUALIDADE DE BIODIESEL (continuação)

Método	Parâmetro de qualidade aplicável	Resumo
EN15779 ¹⁰¹	Teor de ésteres poliinsaturados	Utiliza coluna de fase estacionária polar, e o biodiesel é injetado diluído em tolueno, juntamente com um padrão interno. Identifica os picos de ésteres com 4 insaturações ou mais na cadeia, quantificando estes ésteres. Detector de ionização por chama.

3.4 Validação de métodos

3.4.1 Metrologia e Validação

A metrologia é definida como a ciência da medição e suas aplicações. Ela abrange todos os aspectos técnicos e práticos relativos às medições, e possui uma divisão em três áreas: metrologia científica, industrial e legal. A metrologia é extremamente relevante nas relações industriais e comerciais globalizadas, no meio ambiente, na saúde pública e pessoal, na proteção ao consumidor e em processos judiciais. Um requisito formal (e freqüentemente legal) aos laboratórios de química analítica, é a introdução de medidas de garantia da qualidade, para assegurar que sejam capazes de produzir resultados com a qualidade adequada ao uso pretendido.

Os laboratórios de ensaio devem atender requisitos internacionais de qualidade a fim de atender exigências acerca dos resultados de sua análises, e tais requisitos, no Brasil, encontram-se descritos na norma ABNT NBR ISO/IEC (Associação Brasileira de Normas Técnicas, Norma Brasileira, International Organization for Standardization/ International Electrotechnical Commission) 17025²¹. A norma, de forma genérica, engloba requisitos do sistema de

qualidade que o laboratório deve manter e requisitos técnicos. Dentre os requisitos do sistema, há detalhes a serem seguidos quando da definição de atribuições e responsabilidades da organização; controle de documentos e registros; suprimento de bens e serviços; auditorias internas e análises críticas; ações corretivas e preventivas; subcontratação de ensaios; ensaio não conforme. Dentre os requisitos técnicos, pode-se citar: qualificação e competência de pessoal; acomodações e condições ambientais; métodos e procedimentos de ensaio; equipamentos; amostragem; rastreabilidade da medição; ensaios de proficiência; auditorias técnicas; manuseio de itens; incerteza de medição. Por consenso internacional, o laboratório que atende a norma de forma integral garante a qualidade dos seus resultados de ensaio, pois dentro desta garantia, ele disporá de procedimentos de controle da qualidade dos resultados; aplicações de técnicas estatísticas para análise crítica dos resultados; uso regular de materiais de referência; participação em programas interlaboratoriais; ensaios replicados, utilizando-se dos mesmos métodos ou de métodos diferentes, quando aplicável; correlação de resultados de características diferentes de um item; reensaio de itens retidos.

Dentro dos requisitos técnicos, há o item 5.4.5 da referida norma, que trata da validação de métodos. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida.

O laboratório, ao empregar métodos normalizados, necessita demonstrar que tem condições de operá-los de maneira adequada, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implantá-los, não necessitando realizar uma validação, pois em geral um método normalizado a princípio já foi devidamente validado. Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas¹⁰².

Com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar:

- a) Métodos não normalizados;

- b) Métodos criados / desenvolvidos pelo próprio laboratório;
- c) Métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos;
- d) Ampliações e modificações de métodos normalizados.

O processo de validação deve estar escrito em um procedimento, e os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados. Do mesmo modo, o responsável pela realização dos estudos deve ser competente na área e precisa ter conhecimento suficiente sobre o trabalho, sendo capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do mesmo.

No planejamento e execução da validação, sugere-se a seguinte seqüência de trabalho:

- a) Definir a aplicação, objetivo e escopo do método;
- b) Definir os parâmetros de validação e critérios de aceitação;
- c) Verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo;
- d) Qualificar os materiais, por exemplo, padrões e reagentes;
- e) Planejar os experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico; e
- f) Fazer os experimentos de validação.

Os parâmetros de validação devem estar claramente declarados no procedimento documentado e incluir, quando aplicável:

- a) Seletividade;
- b) Linearidade;
- c) Sensibilidade;
- d) Faixa de Trabalho e Faixa Linear;
- e) Limite de detecção;
- f) Limite de quantificação;
- g) Tendência / recuperação;
- h) Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade¹⁰³);

i) Robustez.

Os parâmetros que necessitam ser calculados durante o processo de validação podem variar de acordo com o tipo de ensaio, como é sugerido na Tabela 5¹⁰². Outros parâmetros podem ser incluídos e/ou excluídos, dependendo das condições do método.

TABELA 5 – PARÂMETROS GERAIS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Parâmetros	Tipo de ensaio			
	Qualitativo	Determinação do componente (ou analito) em maior teor*	Análise de elementos menores e traços**	Propriedades físicas
Precisão		√	√	√
Seletividade	√	√	√	√
Tendência / recuperação		√	√	√
Robustez	√	√	√	√
Sensibilidade / Linearidade / faixa de trabalho		√	√	√
Limite de detecção	√		√	
Limite de quantificação			√	

(*) Dependendo da faixa de concentração do analito pode não ser necessária a determinação dos limites de detecção e de quantificação, como aqueles com concentração entre 1 e 100 %.

(**) São consideradas de menor teor concentrações entre 0,01 e 1 % e elementos traços concentrações abaixo de 0,01 %.

Segue definição dos parâmetros de validação¹⁰⁴⁻¹⁰⁵.

Seletividade

Também chamada especificidade, é a capacidade do método em determinar com exatidão o analito de interesse na presença de componentes passíveis de estarem presentes na amostra, como impurezas, produtos de degradação, efeitos de matriz, etc.

Linearidade

Consiste na capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Sensibilidade

É a taxa de mudança de resposta analítica em relação à mudança de concentração do analito. Em geral, é expressa pelo coeficiente angular em uma curva analítica, obtido por regressão linear ou experimentalmente.

Faixa de trabalho / intervalo

É a faixa de concentração na qual o analito em questão pode ser determinado com precisão e tendência aceitáveis.

Limite de detecção

É a menor quantidade de analito presente na amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, independentemente do ruído.

Limite de Quantificação

É a menor quantidade de analito presente na amostra, que pode ser determinado com exatidão e precisão aceitáveis.

Exatidão

É o grau de concordância entre o valor medido e o valor de referência.

Precisão

Expressa o grau de dispersão de uma série de medidas e pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Robustez

É a medida da capacidade de permanecer inalterado com pequenas variações nos parâmetros do método.

De forma resumida, a validação de um método é um equilíbrio entre custos, riscos e possibilidades técnicas, conforme segundo Nota 3 do item 5.4.5.3 da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025²¹.

3.4.2 Incerteza de medição

Nesse contexto de garantia da qualidade do resultado analítico, a incerteza é um dos principais parâmetros associados ao resultado de uma medição. Atualmente, é mundialmente reconhecido que o resultado de uma medição não está completo se faltar alguma expressão de incerteza a ele associado. Somente de posse de uma estimativa da incerteza podemos garantir a comparabilidade de dois resultados¹⁰⁶. Formalmente, a nota 2 do item 5.4.5.2 da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025²¹ coloca a avaliação da incerteza de medição do resultado com base no conhecimento científico dos princípios teóricos do método e na experiência prática, como uma das técnicas usadas para a determinação de um desempenho de um método. Logo, a

avaliação (ou estimativa, neste caso), da incerteza está diretamente associada à validação daquele método.

A estimativa de uma incerteza de medição é um processo que envolve algumas etapas, e tais etapas estão descritas a seguir¹⁰⁷.

Especificação do Mensurando

Deve-se escrever uma definição clara (e o mais rigorosa possível) do que está sendo medido, incluindo a relação (fórmula, modelo) entre o mensurando e as grandezas de entrada (isto é, grandezas medidas, constantes, valores dos padrões de calibração etc.) das quais depende.

Identificação das fontes de incerteza

Devem-se listar as possíveis fontes de incerteza. Isto irá incluir as fontes que contribuem para as incertezas das grandezas de entrada da relação especificada no primeiro passo, mas pode incluir outras fontes e devem incluir aquelas fontes originadas de hipóteses químicas (isto é, aproximações feitas no modelo proposto). É recomendável a construção de um “diagrama espinha de peixe” ou “diagrama de causa e efeito” ou de Ishikawa. Um exemplo desse tipo de diagrama (utilizado na estimativa da incerteza da determinação do Ponto de Fulgor calculado para biodiesel) está ilustrado na Figura 26.

Quantificação dos componentes de incertezas

Medir ou estimar o tamanho da incerteza associada a cada fonte de incerteza identificada. É sempre possível estimar ou determinar uma contribuição única para a incerteza associada a um conjunto em separado de fontes de incerteza.

Calcular a incerteza combinada

As contribuições de fontes individuais ou associadas estimuladas na terceira etapa devem ser expressas como desvios padrão, e combinadas de

acordo com a regra apropriada, para produzir a incerteza padrão combinada (u_c). O fator de abrangência apropriado pode ser aplicado para produzir uma incerteza expandida (U), que caracterizará, juntamente com o resultado da medição, o *intervalo de confiança*.

Figura 26 – Diagrama de Ishikawa utilizado na estimativa de incerteza da determinação do Ponto de Fulgor calculado (PFC) para biodiesel.

Existem guias disponíveis para auxílio na estimativa de incerteza¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Porém, assim como é para a validação, não há um padrão estabelecido em que deve ser obrigatoriamente seguido em sua integralidade. Existem muitas variáveis que sempre serão peculiares ao processo de estimativa de incerteza, principalmente de um novo método proposto.

4. EXPERIMENTAL

A parte experimental do trabalho foi subdividida em cinco etapas:

1ª. etapa- Experimentos de caracterização dos antioxidantes sintéticos

utilizados: obtenção dos antioxidantes a serem utilizados no desenvolvimento do método, e caracterização utilizando CG-EM (Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas).

2ª. etapa- Experimentos de desenvolvimento do método proposto:

utilização dos antioxidantes sintéticos utilizados na 1ª etapa para desenvolvimento do método proposto, por CG-DIC (Cromatografia Gasosa-Detector de Ionização por Chama), partindo de condições gerais do método ASTM D6584.

3ª. etapa- Experimentos de otimização do método: verificação de possíveis problemas ou interferentes no método, e execução de correções adequadas.

4ª. etapa- Experimentos de validação do método: elaboração e aplicação de protocolo de validação a fim de validar o método intralaboratorialmente.

5ª. etapa- Experimentos de suporte à estimativa de incerteza de medição: estimativa de incerteza de medição, com o suporte de experimentos para quantificação de determinadas fontes de incerteza.

6ª. etapa- Experimentos de aplicabilidade do método: obtenção de teores de antioxidantes sintéticos de algumas amostras, e interpretação dos resultados com auxílio de medições de estabilidade à oxidação das mesmas amostras.

4.1 Material

4.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados em todos os experimentos realizados são mostrados na Tabela 6.

TABELA 6 – REAGENTES E SOLVENTES

Reagentes	Fonte
Piridina P.A.	Vetec
Antioxidante sintético TBHQ*	-
Antioxidante sintético BHT*	-
MSTFA (<i>N-N</i> -trimetiltrifluoroacetamida)	Merck
n-Heptano P.A.	Isofar
Água grau ASTM I**	-
Solução de Karl Fischer coulométrica anódica	Sigma-Aldrich
Solução de Karl Fischer coulométrica catódica	Sigma-Aldrich
Extran Alcalino	Merck
Peneira Molecular 3A	Metrohm
Acetona P.A.	Isofar
Metanol P.A.	Vetec
Biodiesel NIST (National Institute of Standards and Technology) 2772 (Material de Referência com teor de água certificado)	NIST

(*) Materiais obtidos junto à usina de biodiesel autorizada pela ANP, BIOCAPITAL Participações S/A.

(**) Material obtido com uso do ultrapurificador de água ELGA *Purelab Classic*, com valor de condutividade de 0,1 $\mu\text{S/cm}$, atendendo portanto o grau ASTM I, segundo ASTM D1193¹¹⁰.

4.1.2 Soluções

4.1.2.1 Soluções estoque de antioxidantes sintéticos

As soluções estoque de antioxidantes sintéticos são apresentadas na Tabela 7.

TABELA 7 – SOLUÇÕES ESTOQUE DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

Soluto	Quantidade de soluto (g)	Solvente	Volume total de solução (mL)	Concentração final (mg/mL)
Antioxidante sintético TBHQ 1	0,2062	Piridina	25	8,248
Antioxidante sintético BHT 1	0,2039	Piridina	25	8,156
Antioxidante sintético TBHQ 2	0,2016	Piridina	25	8,064
Antioxidante sintético BHT 2	0,2088	Piridina	25	8,352

4.1.2.2 Soluções de calibração preparadas a partir das soluções estoque

As soluções estoque de antioxidantes sintéticos foram preparadas conforme quantidades apresentadas na Tabela 8 .

TABELA 8 – SOLUÇÕES DE CALIBRAÇÃO

Solução de calibração	1	2	3	4	5
Característica					
Volume de solução estoque de antioxidante adicionado (µL)	20	40	60	80	100
Volume de piridina (µL)	80	60	40	20	0
Volume de MSTFA (µL)	100	100	100	100	100
Volume de n-Heptano (mL)	10	10	10	10	10
Massa de antioxidante sintético* (mg)	0,16496	0,33712	0,50568	0,65984	0,82480

TABELA 8 – SOLUÇÕES DE CALIBRAÇÃO (continuação)

Solução de calibração	1	2	3	4	5
Característica					
Massa de antioxidante sintético* (mg)	0,16312	0,32624	0,48936	0,65248	0,81560
Massa de antioxidante sintético* (mg)	0,16128	0,32256	0,48384	0,64512	0,80640
Massa de antioxidante sintético* (mg)	0,16704	0,33408	0,50112	0,66816	0,83520

(*) Massas obtidas considerando os volumes tomados das soluções estoque da Tabela 7, respectivamente.

4.1.2.3 Preparo de soluções de amostras

As soluções para a leitura de amostras de biodiesel foram preparadas conforme condições estabelecidas na Tabela 9.

TABELA 9 – PREPARO DE SOLUÇÕES PARA LEITURA DE AMOSTRAS

Massa de amostra (mg)	Volume de Piridina (µL)	Volume de MSTFA (µL)	Volume de n-Heptano (mL)
100,0	200	100	10

4.1.3 Vidrarias e Instrumentos volumétricos

4.1.3.1 Vidrarias

Para o preparo das soluções estoque da Tabela 7, foram usados balões volumétricos de 25 mL, devidamente calibrados por laboratório pertencente à RBC (Rede Brasileira de Calibração) para a grandeza volume.

Para o preparo das soluções de calibração da Tabela 8 e das soluções para leitura de amostras, foram utilizados frascos de vidro de 20 mL de capacidade, e pipeta volumétrica de 10 mL, devidamente calibrada por

laboratório pertencente à RBC para a grandeza volume, para a adição do n-Heptano (solvente). Para injeções nos cromatógrafos, foram utilizados frascos de 1,7 mL de vidro, próprios para amostradores automáticos.

4.1.3.2 Instrumentos volumétricos

Para as medições dos volumes menores que 10 mL citados nas Tabelas 8 e 9, foram utilizadas micropipetas volumétricas de volume máximo de 100 μ L, devidamente calibradas por laboratório pertencente à RBC para a grandeza volume.

4.1.4 Balança

Para todas as medições de massa deste trabalho, foi utilizada balança analítica digital com resolução de 0,0001 g, marca Precisa, modelo XT 220A, devidamente calibrada por laboratório pertencente à RBC para a grandeza massa.

4.1.5 Instrumentação analítica

4.1.5.1 Aparelhagem utilizada nos experimentos de caracterização dos antioxidantes sintéticos

O cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 500 com espectrômetro de massas como detector (CG-EM) foi utilizado nos experimentos de caracterização dos antioxidantes sintéticos que seriam utilizados no desenvolvimento do método proposto. Este equipamento fez uso de injetor / amostrador automático, injeção tipo *split*. A coluna selecionada foi de fase estacionária apolar, composta por 95 % dimetilpolisiloxano e 5 % fenil-metilpolisiloxano, de alta temperatura, com separação por ponto de ebulição, de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,10 μ m. O equipamento é controlado por microcomputador, através de software *Turbomass GC-MS* (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) *Perkin Elmer Software*.

4.1.5.2 Aparelhagem utilizada nas demais etapas experimentais

O cromatógrafo Agilent 6890 com detector de ionização por chama (CG-DIC) foi utilizado nas demais etapas experimentais do trabalho. Este equipamento fez uso de injetor / amostrador automático, injeção tipo *on-column*. A coluna selecionada foi do mesmo tipo que a coluna já citada em 4.1.5.1. O equipamento é controlado por microcomputador, através de software *Agilent Chemstation*.

O equipamento Metrohm Karl Fischer Coulometer 831, com seus respectivos acessórios, foi utilizado nas medições de teor de água necessárias durante a etapa de experimentos de otimização do método proposto.

O equipamento Metrohm Rancimat 743, com seus respectivos acessórios, foi utilizado nas medições de Estabilidade à Oxidação necessárias durante a etapa de experimentos de aplicabilidade do método.

4.2 Metodologia

4.2.1 Caracterização dos antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos escolhidos para o trabalho foram o BHT e o TBHQ, visto que são utilizados pelas usinas produtoras de biodiesel conforme informado pela ANP. Nenhuma usina no território nacional tem reportado uso de outros antioxidantes sintéticos à ANP.

As condições gerais da metodologia proposta envolveram as condições cromatográficas similares àquelas observadas nas normas ASTM D6584⁹⁹ e EN14105⁹⁸. É levantada uma curva analítica, com quantidades (massas) conhecidas dos antioxidantes sintéticos. Padrões de antioxidantes sintéticos de grau analítico poderiam vir a ser utilizados, por exemplo, BHT e TBHQ grau analítico. Porém, optou-se pelo uso de antioxidantes comercialmente obtidos junto aos produtores de biodiesel, obviamente com purezas inferiores a padrões analíticos. Isso porque o trabalho tem por objetivo desenvolver método

para a determinação do antioxidante sintético, não somente do composto químico. Para os produtores e para os agentes envolvidos com a cadeia do biodiesel, a informação mais relevante neste caso seria a quantidade real de antioxidante no biodiesel, em detrimento da quantidade de TBHQ, por exemplo.

Experimentos utilizando cromatografia gasosa acoplada com detector de massas (CG-EM) foram procedidos com as soluções-estoque dos antioxidantes comerciais para a caracterização da adequabilidade do uso desses materiais no desenvolvimento do método. As soluções estoque foram preparadas conforme quantidades descritas na Tabela 7. Essas soluções foram injetadas diretamente no sistema CG-EM, com aparelhagem descrita no item 4.1.5.1. Cabe destacar que a coluna e as condições de temperatura ao longo da análise cromatográfica foram escolhidas de forma que fossem de fato semelhantes às condições que seriam utilizadas posteriormente no desenvolvimento do método proposto, com o intuito de já observar o comportamento dos analitos de interesse. As condições de operação do sistema estão descritas na Tabela 10.

TABELA 10 – CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO CG-EM

Injetor		
Injeção split	Razão 18:1	
Volume injetado	1 µL	
Temperatura	310 °C	
Programação do forno		
Temperatura inicial	50°C	1,5 min
Rampa 1	15°C / min até 180°C	0 min
Rampa 2	7°C / min até 230°C	0 min
Rampa 3	20°C / min até 375°C	17 min
Detector		
Tipo	Multiplicadora de elétrons	
Analizador	Quadrupolo	
Ionização	Eletrônica, modo positivo	
Gás de arraste		
Tipo	Hélio	
Vazão	1,5 mL/min	

4.2.2 Desenvolvimento do método proposto

Uma vez prontas as soluções estoque, foram preparadas soluções de calibração, conforme quantidades apresentadas na Tabela 8. O solvente para a solução estoque escolhido foi a piridina, por três razões, sendo:

- a) A piridina é um solvente que solubiliza instantaneamente tanto os compostos de interesse quanto o próprio biodiesel;
- b) A piridina é um solvente que permite que reações de derivatização, mais especificamente silanização, procedam com alto rendimento¹¹¹;
- c) A piridina é o solvente utilizado nas determinações quantitativas de glicerol e seus derivados⁹⁸⁻⁹⁹, resultantes da reação de transesterificação para obtenção de biodiesel, ou seja, é um solvente disponível em todos os laboratórios de certificação de biodiesel.

Poder-se-ia, em teoria, utilizar outro solvente que favorecesse a derivatização, por exemplo, acetonitrila, de toxicidade menor que a piridina¹¹². Ocorre que neste caso seria necessária uma etapa adicional de extração, o que aumentaria consideravelmente o tempo de análise. Além disso, possíveis novas condições para a derivatização (tempo e temperatura de reação, por exemplo) deveriam ser testadas⁹⁰.

Após segregação dos volumes de soluções estoque, faz-se a reação de derivatização com MSTFA, adicionando-se em cada solução de calibração 100 µL deste reagente (quantidade em excesso), e deixou-se reagir por 20 minutos, em temperatura ambiente, para que a reação fosse concluída, ou seja, a remoção do grupo (-OH) e a introdução do grupo trimetilsilil¹¹³⁻¹¹⁶. A Figura 27 ilustra o mecanismo da reação de silanização do TBHQ com MSTFA. Esta reação permite a análise quantitativa dos antioxidantes sintéticos por cromatografia gasosa. O solvente é fator decisivo no alto rendimento dessa reação, pois ele pode atuar como base de Lewis para a ativação da reatividade dos grupos que serão removidos¹¹¹.

Figura 27 – Reação geral de silanização do TBHQ com MSTFA. Os radicais (-OH) são substituídos por grupos trimetilsilano.

Após esta etapa, é feita uma diluição das soluções com 10 mL de n-heptano, para injeção no cromatógrafo, e feita posterior identificação dos picos para levantamento da curva analítica. A faixa de massas de antioxidantes coberta pelas curvas analíticas foi de aproximadamente 0,16 mg (primeiro ponto) a aproximadamente 0,82 mg (quinto ponto), massas essas detalhadas na Tabela 8. A Tabela 11 apresenta as condições cromatográficas.

A aparelhagem utilizada no método proposto está descrita no item 4.1.5.2. O uso do detector de ionização por chama é devido ao favorecimento de uma análise quantitativa de compostos orgânicos, por parte deste tipo de detector, sendo notória sua estabilidade. A coluna de fase estacionária apolar é comumente utilizada nas determinações de gliceróis, portanto de aplicação já conhecida para biodiesel. O uso desta coluna para alta temperatura também se

justifica pelo fato do método não prever etapa de extração, logo a amostra é injetada integralmente no cromatógrafo, e amostras como o biodiesel possuem constituintes de peso molecular relativamente alto (maiores que 600 Da como, por exemplo, alguns triacilgliceróis), sendo necessária uma coluna de alta temperatura para total eluição destes compostos. Já o emprego de injetor *on-column* também é justificado para garantir uma melhor quantificação, melhorando a sensibilidade para faixas de concentração menores que 0,1 % em massa, além de possibilitar a verificação da eficiência da reação de derivatização.

TABELA 11 – CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO

Injetor		
Injeção on-column		
Volume injetado	1 µL	
Temperatura	Acompanha programação do forno	
Programação do forno		
Temperatura inicial	50°C	1 min
Rampa 1	15°C / min até 180°C	0 min
Rampa 2	7°C / min até 230°C	0 min
Rampa 3	30°C / min até 380°C	10 min
Detector		
Tipo	Ionização por chama de Hidrogênio	
Temperatura	380°C	
Vazão de Hidrogênio	35 mL/min	
Vazão de ar sintético	450 mL/min	
Vazão de Nitrogênio (gás auxiliar)	30 mL/min	
Tempo total de corrida	Aproximadamente 35 minutos	
Gás de arraste		
Tipo	Hélio	
Vazão	3 mL/min	

Caso a reação ocorra parcialmente, o uso deste injetor possibilita, ao observar o cromatograma, se a reação de derivatização foi de fato efetiva. Produtos não-derivatizados tendem a alargar o pico do analito dificultando uma quantificação segura¹¹².

Para análise de amostras, foram tomadas massas de aproximadamente 100 mg, com valor devidamente registrado com aproximação de 0,1 mg. Essa quantidade de amostra é a mesma que é utilizada nos métodos de determinação dos teores de glicerol livre e glicerol total⁹⁸⁻⁹⁹. A amostra é então diluída com 200 µL de piridina, para posteriormente ser adicionado reagente MSTFA em quantidade de 100 µL (excesso), e a reação processa-se por 20 minutos, em temperatura ambiente. Cabe ressaltar que ao contrário das soluções de calibração, a amostra de biodiesel contém uma série de compostos que também são passíveis de sofrerem reações de silanização, como o próprio glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis. O excesso de MSTFA não foi adicionado por conta da presença desses compostos, pois a quantidade de reagente silanizante já é suficiente para a silanização de todos os compostos silanizáveis presentes no biodiesel, sendo 100 µL de MSTFA para 100 mg de biodiesel; os compostos silanizáveis, considerando um biodiesel especificado, não têm teor superior a 3,5 % em massa. A Figura 28 apresenta um esquema da metodologia proposta, passo a passo.

Após a reação, as amostras foram diluídas com 10 mL de n-heptano, e injetadas no cromatógrafo. Identificado o pico de interesse, através dos tempos de retenção das soluções de calibração, e faz-se a quantificação utilizando a equação da curva analítica, obtida por regressão linear. É importante também destacar que no momento da obtenção da massa de antioxidante na amostra por meio da equação da curva analítica, os resultados foram convertidos para mg/kg, através da divisão pela massa da amostra, obtida inicialmente na pesagem, e posterior multiplicação pelo fator 10⁶. Sendo assim, o resultado da análise é descrito pela equação 1.

$$C = \frac{m_{ant}}{m_{biod}} * 10^6 \quad (1)$$

Onde:

C é a concentração de antioxidante na amostra de biodiesel, em mg/kg.

m_{ant} é a massa de antioxidante, obtida pela regressão linear, em miligramas.

m_{biod} é a massa de biodiesel, obtida na pesagem, em miligramas.

Figura 28 – Esquema-resumo da metodologia proposta

4.2.3 Otimização do método

Quando do desenvolvimento do método, foi detectada influência importante do teor de água nas amostras. Tal influência é tratada com detalhes na seção 5. Assim sendo, foram necessárias análises de determinação do teor de água de algumas amostras, segundo método ASTM D6304¹¹⁷, análise gravimétrica, injetando-se aproximadamente 1,5 g de amostra. Após a detecção de tal influência, o método foi mantido com as mesmas condições descritas em 2.2, porém com considerações acerca de requisitos para amostras a serem analisadas pelo método proposto. Maior detalhamento é tratado na seção 5.

4.2.4 Validação do método

Para a validação do método, elaborou-se protocolo de validação próprio, pois para a validação de métodos em biodiesel não há um protocolo de referência. Assim sendo, o protocolo foi desenvolvido a partir de referências já estabelecidas^{102,104-105} e de referência de validação na área de cromatografia¹¹⁸. A Tabela 12 apresenta com detalhes o protocolo de validação seguido para a metodologia, assim como os resultados obtidos. Abaixo, seguem comentários acerca dos parâmetros utilizados.

Exatidão

A Exatidão é, geralmente, determinada por intermédio do uso de uma amostra certificada cuja concentração do analito de interesse é conhecida. Porém, devido à inexistência de uma amostra de biodiesel certificada para concentração dos compostos antioxidantes, optou-se por avaliar a exatidão juntamente com a recuperação, isto é, utilizar uma amostra isenta de antioxidante e adicionar quantidade conhecida de antioxidante, e proceder à análise (fortificação).

Precisão

Avaliou-se aqui o coeficiente de variação (ou desvio-padrão relativo) ao se injetar um mesmo padrão dez vezes.

Fidelidade – Repetibilidade de áreas e tempos de retenção

A fidelidade analítica tem sido estabelecida em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo que a primeira expressa a fidelidade obtida nas mesmas condições operacionais, aplicadas em um curto espaço de tempo; a segunda refere-se às variações ocorridas dentro de um mesmo laboratório quando um ou mais fatores importantes são mudados; a terceira designa a fidelidade entre laboratórios, geralmente obtida em análises colaborativas.

No presente trabalho, obteve-se apenas a fidelidade no nível de repetibilidade, ficando os demais níveis como sugestões para a continuidade dos estudos.

Tanto para área de pico quanto para tempo de retenção, utilizou-se a relação:

$$CV = \frac{s_r}{x} \times 100 \%$$

Onde:

CV é o coeficiente de variação;

x é a média de áreas de pico ou de tempo de retenção;

s_r é o desvio-padrão de repetibilidade.

Linearidade

Neste caso, verificaram-se os coeficientes de correlação (r) obtidos. Deve-se lembrar que o coeficiente de correlação não é o mesmo que o coeficiente de determinação (r^2). O coeficiente de correlação traz informação de quanto de similaridade que a resposta instrumental tem com a equação da reta obtida por regressão linear; o coeficiente de determinação traz a informação de efetiva relação entre a variação da resposta instrumental e a quantidade de analito.

Metodologia para determinação de limite de detecção e quantificação

A metodologia escolhida para obtenção de LD e LQ (Limite de Detecção e Limite de Quantificação) envolve as curvas limites de confiança e curvas limites de previsão, inferiores e superiores para um dado nível de confiança escolhido¹¹⁹. A escolha de tal método se deu porque ele leva em consideração as variações de todos os níveis de concentração da curva analítica. Como a regressão linear é um modelo matemático criado pela análise, todas as mudanças nesse modelo que influenciem as relações matemáticas, terão efeito no LD e LQ. Na prática, quanto mais imprecisas as medições em todos os níveis de concentração, mais distantes graficamente as CLCs e a CLPs (curvas limites de confiança e curvas limites de previsão) ficarão em relação à curva analítica, gerando LDs e LQs mais altos.

Sensibilidade

A sensibilidade, em geral, é determinada por intermédio da inclinação do gráfico da curva analítica, indicando que o método é tão mais sensível quanto maior for o coeficiente angular da reta de regressão linear. Este parâmetro é particularmente útil quando da comparação destes coeficientes angulares de outras retas de regressão obtidas por outros métodos, na mesma faixa de aplicação. Porém, a não-disponibilidade de tais coeficientes obtidos por outros métodos foi uma dificuldade, então optou-se por uma comparação com método por CLAE⁸⁴ disponível na literatura, mesmo sem exatamente a mesma faixa de trabalho ser coberta.

Seletividade

Este parâmetro foi avaliado de forma qualitativa, por interpretação dos cromatogramas, verificando-se possibilidade de co-eluições.

Estabilidade

Para a definição deste parâmetro, foram feitas injeções da mesma amostra ao longo do tempo a fim de se verificar quando que havia uma variação maior que 2 % da concentração medida. Após este período, uma nova curva analítica deveria ser levantada.

4.2.5 Incerteza de medição

A incerteza de medição foi estimada utilizando diretrizes do Guia *Eurachem:CITAC* (Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry) *Relacre* (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal)¹⁰⁹, que é um guia de estimativa de incertezas analíticas baseado no *ISO GUM* (Guide of Uncertainty Measurement)¹⁰⁸, e no *Guia Eurachem: CITAC*¹⁰⁷ específico para ensaios químicos, e de divulgação europeia. Como o método utiliza regressão linear, sabe-se que a incerteza de medição é uma variável da concentração, logo, apresenta valor máximo e mínimo ao longo da faixa de trabalho. Sendo assim, optou-se por estabelecer um limite de 20 % para a maior incerteza expandida encontrada no intervalo de aplicação, como critério de aceitação. Maior detalhamento da estimativa de incerteza de medição é exposto na seção 5.

TABELA 12 – PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO

Parâmetro	Método utilizado	Critérios de aceitação¹¹⁸
Exatidão	Análise de amostra “branco” fortificada com quantidade de antioxidante conhecida (recuperação)	Recuperação entre 70 e 120 % com 3 replicatas em 3 níveis de concentração distintos
Precisão	Obtenção do coeficiente de variação para dez injeções de padrão	Coeficiente de variação $\leq 1 \%$
Repetibilidade de áreas	Obtenção da repetibilidade da área do pico, através de dez injeções de uma solução de calibração	Coeficiente de variação $\leq 1 \%$

TABELA 12 – PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO (continuação)

Parâmetro	Método utilizado	CrITÉRIOS de aceitação ¹¹⁸
Repetibilidade de tempos de retenção	Obtenção da repetibilidade do tempo de retenção, através de dez injeções de uma solução de calibração	Coefficiente de variação $\leq 1 \%$.
Linearidade	Avaliação dos coeficientes de correlação das curvas analíticas	Coefficiente de correlação $\geq 0,999$
	Testes de premissas: <i>outliers</i> , normalidade de resíduos, independência de resíduos e homocedasticidade para definição das regressões lineares	Aprovação em todos os testes: adoção da regressão linear ordinária. Caso contrário, regressão linear ponderada
Limite de detecção	Cruzamento entre as curvas de previsão e analítica ¹¹⁹	$LD \leq 70 \%$ do primeiro nível de concentração da curva analítica
Limite de quantificação	Cruzamento entre as curvas de previsão e analítica ¹¹⁹	$LQ \leq$ primeiro nível de concentração da curva analítica
Sensibilidade	Obtenção dos coeficientes angulares	Comparação com método CLAE ⁸⁴
Seletividade	Observação dos cromatogramas	Verificação de co-eluições
Estabilidade	Avaliação em injeções da mesma amostra ao longo do tempo	Variação de resultado $\leq 2 \%$
Intervalo de aplicação (faixa de trabalho)	Definição entre o limite de quantificação e o último ponto da curva analítica	-
Incerteza de medição	Estimada com base em guias ^{107/-} 109	U máxima $\leq 20 \%$ do valor determinado

4.2.6 Aplicabilidade do método

Após validação do método, este foi aplicado em amostras de biodiesel comerciais, com o intuito de se obter informações acerca do desempenho dos antioxidantes BHT e TBHQ, a fim de se confirmar o que a literatura tem reportado, quando usados em biodiesel. A estabilidade à oxidação foi medida utilizando-se o método Rancimat, segundo a norma EN14112¹⁶.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos antioxidantes sintéticos

As Figuras 29 e 30 mostram cromatogramas de corrente iônica total, obtidos em modo *scan* para as soluções-estoque dos antioxidantes comerciais, correspondentes ao TBHQ e ao BHT. Já as Figuras 31 a 36 trazem os espectros de massa obtidos para os principais picos observados nos cromatogramas de corrente iônica total, sempre confrontando com espectros de massa de referência indicados pela biblioteca NIST disponível no software do equipamento (item 4.1.5.1), com a devida percentagem de similaridade. Para TBHQ, a somatória das áreas dos picos em 9,34 e 6,29 minutos correspondeu a 98,7 % das áreas totais do cromatograma, sendo que 82,4 % referente ao pico em 9,34 minutos. Para BHT, a soma dos picos em 8,4; 6,86; 8,93 e 9,64 minutos correspondeu a 97,1 % das áreas totais do cromatograma, sendo que 73,5 % referente ao pico em 8,4 minutos.

Figura 29 – Cromatograma de corrente iônica total obtido no experimento CG-EM para TBHQ comercial.

Figura 30 – Cromatograma de corrente iônica total obtido no experimento CG-EM para BHT comercial.

Figura 31 – Espectro de massas para pico em 9,34 minutos no cromatograma da Figura 29 (acima). Espectro referência do TBHQ (abaixo). Similaridade de 92,8 %.

Figura 32 – Espectro de massas para pico em 6,29 minutos no cromatograma da Figura 29 (acima). Espectro referência de quinona precursora do TBHQ (abaixo). Similaridade de 94,7 %.

Figura 33 – Espectro de massas para pico em 9,64 minutos no cromatograma da Figura 30 (acima). Espectro referência de derivado de BHT – 2,4,6-t-butil-fenol (abaixo). Similaridade de 92,7 %.

Figura 34 – Espectro de massas para pico em 8,4 minutos no cromatograma da Figura 30 (acima). Espectro referência do BHT (abaixo). Similaridade de 92,6 %.

Figura 35 – Espectro de massas para pico em 6,86 minutos no cromatograma da Figura 30 (acima). Espectro referência de derivado de BHT – 2-t-butil-fenol (abaixo). Similaridade de 95,5%.

Figura 36 – Espectro de massas para pico em 8,93 minutos no cromatograma da Figura 30 (acima). Espectro referência de derivado de BHT – 2-t-butil-fenol (abaixo). Similaridade de 93,7%.

As análises realizadas por CG-EM indicaram que os antioxidantes sintéticos comerciais obtidos contêm apenas TBHQ, BHT e seus derivados, conforme suas estruturas demonstram. Nos espectros de massa, não foram detectados compostos que fossem interferentes na atividade antioxidante ou de natureza diferente de TBHQ e BHT. Portanto, o uso analítico desses antioxidantes comerciais, tal como são comercializados aos produtores de biodiesel, permite a análise do produto que de fato é adicionado ao biodiesel em seu processo produtivo, possibilitando que a metodologia proposta venha a

quantificar o antioxidante como um todo, monitorando sua concentração após a aditivação, e não somente um composto específico isolado.

5.2 Desenvolvimento do método proposto

As Figuras 37 a 39 ilustram cromatogramas obtidos quando do desenvolvimento do método. Cabe destacar que os cromatogramas indicam que pelo menos para TBHQ e BHT, os tempos de retenção observados para os compostos de interesse não coincidiram com tempos de retenção de glicerol ou de 1,2,4-butanotriol. Este último é padrão interno na análise de glicerol⁹⁸⁻⁹⁹. Conseqüentemente, a metodologia poderia em princípio ser utilizada simultaneamente para análise de glicerol livre e glicerol total. Certamente, em caso de antioxidante que venha a apresentar co-eluição, deve-se rever o uso da metodologia para o referido antioxidante.

Figura 37 – Cromatograma obtido para amostra de biodiesel livre de antioxidantes, com o glicerol e o butanotriol devidamente identificados.

Figura 38 – Cromatograma obtido para amostra de biodiesel fortificada com 6587 mg/kg de TBHQ.

Figura 39 – Cromatograma obtido para amostra de biodiesel fortificada com 2254 mg/kg de BHT.

5.3 Otimização do método

Nos cromatogramas inicialmente obtidos, percebeu-se que o formato do pico de interesse era diferente, quando da corrida com a amostra em relação às corridas das soluções de calibração. O formato do pico nas corridas das soluções de calibração era mais apropriado para uma análise quantitativa, pois nas corridas com amostras o pico se apresentava mais alargado (Figura 40). Mesmo que a quantificação utilizando os valores de área devido à integração automática do software tenha ficado satisfatória, uma investigação acerca da diferença no formato era necessária, e resultados de quantificação de antioxidantes obtidos até então foram desconsiderados.

Em linhas gerais, em cromatografia gasosa, quando se utilizam reações de silanização, a efetividade da reação pode ser verificada pelo formato do pico esperado. Logo, foram levantadas variáveis que pudessem afetar a reação de silanização, em especial na presença de amostra. Como já explicado anteriormente, a amostra de biodiesel possui outros compostos silanizáveis, o que poderia causar uma “concorrência” na reação, onde os compostos naturalmente presentes no biodiesel teriam uma “preferência” em sofrer a silanização em detrimento dos compostos antioxidantes. Na literatura, é constatado que quando do uso de silanização em óleos, é realizada previamente uma extração dos compostos fenólicos de interesse, para minimizar interferências de componentes do óleo¹¹⁵. No caso do biodiesel, em se considerando que compostos como glicerol e derivados de glicerol estão presentes em concentrações máximas individuais de 10000 mg/kg, e que os antioxidantes têm sido determinados entre 900 e 5000 mg/kg (em biodiesel)⁸⁵⁻⁸⁷, poder-se-ia imaginar que efetivamente o glicerol e seus derivados interfeririam na reação. Porém, o agente derivatizante (MSTFA) é adicionado em excesso, 100 µL para 100 mg de amostra. Esta quantidade, em princípio, deveria garantir a silanização de todas as espécies silanizáveis da amostra. Fatores como temperatura, cinética e estereoquímica também podem influir no direcionamento de reações de silanização quando existem muitas espécies

silanizáveis¹¹⁴. Mas, segundo a literatura, o fator de maior interferência na efetividade da reação é a presença de teores de água¹¹³⁻¹¹⁵.

Sabe-se que o biodiesel, ao contrário de combustíveis derivados de petróleo, tende a ser muito mais higroscópico, logo, certo teor de água em uma amostra, como por exemplo, 1000 mg/kg, em uma amostra de óleo diesel fóssil causa turbidez bem visível, enquanto que o mesmo teor em biodiesel não é percebido apenas pelo aspecto de uma amostra, ficando esta quantidade de água dissolvida¹. Como o método foi testado com amostras comerciais de biodiesel, mesmo quando fortificadas com antioxidantes (neste caso, foram utilizadas amostras de biodiesel de gordura animal, sem adição de antioxidante sintético no processo, conforme informação da usina produtora), verificou-se então o teor de água total de amostras até então processadas durante o método, utilizando-se método descrito na norma técnica ASTM D6304¹¹⁷. Os dados obtidos estão na Tabela 13. Observou-se que o teor de água das amostras utilizadas até então estava acima do permitido na especificação da ANP¹⁴ (máximo de 350 mg/kg) em todos os casos, o que pode estar relacionado a condições de armazenamento do biodiesel. Isso indicou que existia uma limitação à metodologia proposta, que seria o teor de água das amostras a serem analisadas. Esse fator, apenas pelo cromatograma seria de difícil elucidação porque a água é invisível a um detector DIC.

Após os resultados dos teores de água obtidos, um novo conjunto de amostras, desta vez com um teor de água conforme a especificação da ANP na época (na oportunidade, o limite especificado era de 500 mg/kg)¹²⁰, foi providenciado para posterior verificação dos formatos dos picos. Isso indicaria se realmente a água presente em teores considerados altos estava interferindo de fato na reação de silanização dos compostos de interesse. A tabela 14 traz os resultados dos teores de água obtidos pelo mesmo método usado. A Figura 40 também ilustra o formato do pico observado no cromatograma para uma dessas amostras, onde foi observada melhor definição do pico.

TABELA 13 – TEOR DE ÁGUA NAS AMOSTRAS UTILIZADAS INICIALMENTE NO DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA

Teor de água encontrado (mg/kg)	Característica da amostra	Reprodutibilidade do método ASTM D6304 para o valor referido (mg/kg)
982	Fortificada com 1500 mg/kg de antioxidante	105
754	Fortificada com 2300 mg/kg de antioxidante	90
680	Amostra comercial, quantificada com 1275 mg/kg de antioxidante	85
195	Padrão de referência NIST 2772 certificado com (180 ± 20) mg/kg de água	39

Após isso, optou-se por trabalhar apenas com amostras que atendessem a especificação da época para teor de água - 500 mg/kg. Não foram observados desvios significativos nos resultados de teor de água, e para a garantia da qualidade desses resultados foi utilizado padrão de referência NIST 2772, cuja matriz é um biodiesel de soja, com valor certificado para teor de água (amostra 4 da Tabela 13).

Figura 40 – Região de cromatograma com destaque para o pico correspondente ao antioxidante TBHQ, para amostra de biodiesel com 982 mg/kg de teor de água (azul) e 509 mg/kg de água (vermelho).

TABELA 14 – TEOR DE ÁGUA PARA O NOVO CONJUNTO DE AMOSTRAS

Teor de água encontrado (mg/kg)	Característica da amostra	Reprodutibilidade do método ASTM D6304 para o valor referido (mg/kg)
509	Fortificada com 1554 mg/kg de antioxidante	71
425	Fortificada com 2268 mg/kg de antioxidante	64
487	Amostra comercial, quantificada com 1104 mg/kg de antioxidante	69
396	Amostra comercial, quantificada com 1388 mg/kg de antioxidante	61
441	Amostra comercial, quantificada com 952 mg/kg de antioxidante	65

5.4 Validação do método

A Tabela 12 apresenta um resumo do protocolo de validação adotado para o método em questão. Já a tabela 15 traz os resultados obtidos quando da aplicação do referido protocolo.

5.4.1 Exatidão

A menor recuperação foi de 92 %, e a maior, de 106 %. Esses resultados de recuperação foram considerados satisfatórios, tendo em vista que genericamente é aceita a faixa que vai de 70 % a 120 %¹⁰². O número de replicatas utilizado foi de apenas uma, visando a uma maior estimativa de incerteza, como tratado quando da discussão deste parâmetro.

5.4.2 Precisão

Os valores obtidos foram também considerados satisfatórios, atendendo ao critério de aceitação de coeficiente de variação $\leq 1,0$ %.

5.4.3 Fidelidade – Repetibilidade de áreas

O valor obtido para a repetibilidade das áreas dos picos de TBHQ e BHT ficou bastante aceitável, visto que os valores de desvio-padrão de 2,95 e 2,16 unidades de área corresponderam a um coeficiente de variação de 1,0 % e 0,8 %, respectivamente.

5.4.4 Fidelidade – Repetibilidade de tempos de retenção

Neste parâmetro, da mesma forma que o anterior, obtiveram-se dados ainda melhores – 0,004 minutos de desvio-padrão corresponderam a um coeficiente de variação de 0,06 %.

TABELA 15 – RESULTADOS DA VALIDAÇÃO

Parâmetro	Resultado obtido para antioxidante TBHQ	Resultado obtido para antioxidante BHT
Exatidão	106 % (para 2341 mg/kg) 103 % (para 3364 mg/kg) 93 % (para 5247 mg/kg)	98 % (para 2158 mg/kg) 92 % (para 3487 mg/kg) 94 % (para 5422 mg/kg)
Precisão	0,33 %	0,14 %
Repetibilidade de áreas	Coeficiente de variação de 1,0 % (para solução de calibração 3, preparada conforme Tabela 8)	Coeficiente de variação de 0,8 % (para solução de calibração 3, preparada conforme Tabela 8)
Repetibilidade de tempos de retenção	Coeficiente de variação de 0,06 % (para solução de calibração 3, preparada conforme Tabela 8)	Coeficiente de variação de 0,06 % (para solução de calibração 3, preparada conforme Tabela 8)
Linearidade	0,999 (<i>r</i> mínimo obtido)	0,999 (<i>r</i> mínimo obtido)
Limite de detecção	0,0054 mg (equivale a 54 mg/kg)	0,0268 mg (equivale a 268 mg/kg)
Limite de quantificação	0,0108 mg (equivale a 108 mg/kg)	0,0536 mg (equivale a 536 mg/kg)
Sensibilidade	535 (menor coeficiente angular obtido)	543 (menor coeficiente angular obtido)
Seletividade	-	-
Estabilidade	18h	18h
Intervalo de aplicação	108-8248 mg/kg	536-8124 mg/kg
Incerteza de medição	Dados relatados no item 5.5	Dados relatados no item 5.5

5.4.5 Linearidade

Neste caso, verificaram-se os coeficientes de correlação (r) obtidos, que apresentaram valores com, no mínimo, três nove após a vírgula. Porém, a regressão linear primeiramente utilizada consistiu no uso de MMQO (Método dos Mínimos Quadrados Ordinário). Segundo a literatura o uso do MMQO para uma regressão linear diretamente a partir dos dados de resposta instrumental (no caso do presente método, as áreas dos picos correspondentes) versus o valor de entrada conhecido (no caso do presente método, a massa de antioxidante, em miligramas) é uma aproximação, e que pode resultar em erros sistemáticos¹¹⁹. Assim sendo, foi verificado se realmente o uso do MMQO era o mais adequado para obtenção de curva analítica para ser usada na quantificação de amostra com teor de antioxidante desconhecido.

Primeiramente, devem ser procedidos testes estatísticos para a verificação de *outliers*, que são dados que devem ser descartados por serem considerados discrepantes em relação ao conjunto; em seguida, os dados devem ser submetidos ao *teste de normalidade de resíduos*, para verificar se os *resíduos* dos dados seguem uma curva normal. Os resíduos são definidos como a diferença dos valores previstos pela suposta curva analítica por MMQO para cada nível de concentração e os valores reais para cada nível. Caso os resíduos não sigam uma normal, o MMQO já não deve ser formalmente utilizado¹²¹.

Caso de fato os resíduos sigam uma normal, o teste de *independência de resíduos* deve ser aplicado, para verificação de tendências entre os resíduos. Caso haja dependência, ou correlação claramente existente, o MMQO também não deve ser utilizado; finalmente, o teste de *homocedasticidade* deve ser procedido, para verificação da homogeneidade das variâncias obtidas em cada nível de concentração (que é a condição de homocedasticidade propriamente dita) quando da leitura das soluções de calibração. A condição de homocedasticidade é necessária para aplicação do MMQO. Pode-se observar graficamente uma condição de *heterocedasticidade* (ausência de homocedasticidade), através do gráfico de resíduos. Se os

resíduos estiverem distribuídos de forma aleatória, o teste de homocedasticidade deve ser necessariamente aplicado, para a dissipação de dúvida. Caso pelo gráfico de resíduos já exista uma tendência clara, a condição de heterocedasticidade é praticamente certa, e a realização dos testes apenas confirma a constatação visual. As Figuras 41 e 42 ilustram gráfico de resíduos obtidos para TBHQ e BHT, respectivamente. Curiosamente, para o primeiro, foi observada clara heterocedasticidade, pois as variâncias dos resíduos tenderam a diminuir quando do aumento da massa de antioxidante. Já para o segundo, a distribuição dos resíduos ficou bem aleatória, de forma que alguma conclusão só foi possível com a aplicação dos testes estatísticos mencionados.

Figura 41 – Gráfico de resíduos obtido para TBHQ.

Figura 42 – Gráfico de resíduos obtido para BHT.

As fórmulas aplicadas em todos os testes na etapa de linearidade encontram-se em anexo neste trabalho. O teste de *outliers* escolhido foi o teste de *Jackknife*, ou do *resíduo padronizado*, que faz uma estimativa se o resíduo individualizado apresenta uma dispersão consideravelmente maior que a do conjunto, recomendando nesse caso sua exclusão¹²¹. Cabe observar que ao todo são 15 resíduos obtidos, pois em cada um dos cinco níveis foram feitas leituras em triplicata. As Tabelas 16 e 17 ilustram a obtenção de dados nesse teste. Não foi verificado nenhum *outlier* nos dados obtidos, visto que J_{ei}

TABELA 16 – TESTE JACKKNIFE PARA TBHQ

Pontos	x_i	y_i	e_i	J_{ei}	r_i	h_i
1	0,16496	95,2	-5,55E+00	-1,772	-1,642	0,200
2	0,16496	96,4	-4,35E+00	-1,324	-1,287	0,200
3	0,16496	96,9	-3,85E+00	-1,154	-1,139	0,200
4	0,32992	195,2	6,09E+00	1,847	1,697	0,100
5	0,32992	195	5,89E+00	1,770	1,641	0,100
6	0,32992	195,3	6,19E+00	1,887	1,725	0,100
7	0,49488	276,5	-9,73E-01	-0,257	-0,266	0,067
8	0,49488	278,1	6,27E-01	0,165	0,172	0,067
9	0,49488	279	1,53E+00	0,404	0,418	0,067
10	0,65984	364,8	-1,03E+00	-0,278	-0,288	0,100
11	0,65984	366,3	4,67E-01	0,125	0,130	0,100
12	0,65984	364,6	-1,23E+00	-0,332	-0,344	0,100
13	0,82480	452,9	-1,29E+00	-0,369	-0,382	0,200
14	0,82480	452,8	-1,39E+00	-0,398	-0,412	0,200
15	0,82480	453,1	-1,09E+00	-0,312	-0,323	0,200

TABELA 17 – TESTE JACKNIFE PARA BHT

Pontos	x_i	y_i	e_i	J_{ei}	r_i	h_i
1	0,16248	225,1	4,67E+00	0,479	0,493	0,200
2	0,16248	224,7	4,27E+00	0,437	0,451	0,200
3	0,16248	224,3	3,87E+00	0,395	0,409	0,200
4	0,32496	436,9	-6,30E-01	-0,060	-0,063	0,100
5	0,32496	439	1,47E+00	0,141	0,147	0,100
6	0,32496	438,6	1,07E+00	0,103	0,107	0,100
7	0,48744	638,2	-1,64E+01	-1,726	-1,608	0,067
8	0,48744	639,3	-1,53E+01	-1,585	-1,500	0,067
9	0,48744	637,6	-1,70E+01	-1,806	-1,667	0,067
10	0,64992	883,4	1,17E+01	1,182	1,164	0,100
11	0,64992	882,7	1,10E+01	1,103	1,094	0,100
12	0,64992	889,7	1,80E+01	1,984	1,792	0,100
13	0,81240	1086,2	-2,62E+00	-0,267	-0,277	0,200
14	0,81240	1085,2	-3,62E+00	-0,370	-0,383	0,200
15	0,81240	1088,5	-3,20E-01	-0,033	-0,034	0,200

crítico para 15 dados é de 2,179 em um nível de confiança de 95 %. Para TBHQ, o maior J_{ei} foi de 1,725 e para BHT foi de 1,984.

Para o teste de normalidade de resíduos, foi escolhido o teste de *Ryan-Joiner*, que faz uma distribuição crescente dos resíduos e verifica se existe tendência de normalidade¹²¹. As Tabelas 18 e 19 trazem os dados obtidos quando da aplicação deste teste. Os valores de R calculados foram de 0,9502 e 0,9691 para TBHQ e BHT respectivamente. Para um número de 15 resíduos, o R crítico é de 0,9383 para um nível de confiança de 95 %. Neste teste, para que exista tendência de normalidade, o R calculado deve ser maior que o R crítico.

Para verificação da independência de resíduos, foi utilizado o teste de *Durbin-Watson*, que avalia tal independência a partir da divisão das somas quadráticas das diferenças entre os resíduos adjacentes e dos próprios resíduos¹²¹. As Tabelas 20 e 21 ilustram os dados obtidos neste teste para TBHQ e BHT respectivamente, e as Figuras 43 e 44 trazem o gráfico referente a este teste, onde pode-se visualmente constatar a independência ou não entre os resíduos.

TABELA 18 – TESTE RYAN-JOINER PARA TBHQ

Pontos	p_i	q_i	e_i
1	0,0410	-1,7394	-5,55E+00
2	0,1066	-1,2450	-4,35E+00
3	0,1721	-0,9458	-3,85E+00
4	0,2377	-0,7137	-1,39E+00
5	0,3033	-0,5150	-1,29E+00
6	0,3689	-0,3349	-1,23E+00
7	0,4344	-0,1651	-1,09E+00
8	0,5000	0,0000	-1,03E+00
9	0,5656	0,1651	-9,73E-01
10	0,6311	0,3349	4,67E-01
11	0,6967	0,5150	6,27E-01
12	0,7623	0,7137	1,53E+00
13	0,8279	0,9458	5,89E+00
14	0,8934	1,2450	6,09E+00
15	0,9590	1,7394	6,19E+00

TABELA 19 – TESTE RYAN-JOINER PARA BHT

Pontos	p_i	q_i	e_i
1	0,0410	-1,7394	-1,70E+01
2	0,1066	-1,2450	-1,64E+01
3	0,1721	-0,9458	-1,53E+01
4	0,2377	-0,7137	-3,62E+00
5	0,3033	-0,5150	-2,62E+00
6	0,3689	-0,3349	-6,30E-01
7	0,4344	-0,1651	-3,20E-01
8	0,5000	0,0000	1,07E+00
9	0,5656	0,1651	1,47E+00
10	0,6311	0,3349	3,87E+00
11	0,6967	0,5150	4,27E+00
12	0,7623	0,7137	4,67E+00
13	0,8279	0,9458	1,10E+01
14	0,8934	1,2450	1,17E+01
15	0,9590	1,7394	1,80E+01

TABELA 20 – TESTE DE DURBIN-WATSON PARA TBHQ

Pontos	e_i	e_{i-1}	$e_i - e_{i-1}$
1	-5,55E+00		
2	-4,35E+00	-5,5533	1,20E+00
3	-3,85E+00	-4,3533	5,00E-01
4	6,09E+00	-3,8533	9,94E+00
5	5,89E+00	6,0867	-2,00E-01
6	6,19E+00	5,8867	3,00E-01
7	-9,73E-01	6,1867	-7,16E+00
8	6,27E-01	-0,9733	1,60E+00
9	1,53E+00	0,6267	9,00E-01
10	-1,03E+00	1,5267	-2,56E+00
11	4,67E-01	-1,0333	1,50E+00
12	-1,23E+00	0,4667	-1,70E+00
13	-1,29E+00	-1,2333	-6,00E-02
14	-1,39E+00	-1,2933	-1,00E-01
15	-1,09E+00	-1,3933	3,00E-01

Para TBHQ, o teste foi conclusivo, verificando correlação positiva entre os resíduos, ou seja, não foi observada independência, pois o valor de d calculado foi 0,8986, sendo o d crítico 1,08 para 15 resíduos. Para BHT, o teste foi inconclusivo, pois o d calculado obtido foi de 1,1317, maior que o d crítico, porém menor que 1,36; valor mínimo para comprovar a independência entre os resíduos. Sendo assim, para TBHQ o uso do MMQO foi considerado inadequado segundo este teste.

TABELA 21 – TESTE DE DURBIN-WATSON PARA BHT

Pontos	e_i	e_{i-1}	$e_i - e_{i-1}$
1	4,67E+00		
2	4,27E+00	4,6667	-4,00E-01
3	3,87E+00	4,2667	-4,00E-01
4	-6,30E-01	3,8667	-4,50E+00
5	1,47E+00	-0,6300	2,10E+00
6	1,07E+00	1,4700	-4,00E-01
7	-1,64E+01	1,0700	-1,75E+01
8	-1,53E+01	-16,4267	1,10E+00
9	-1,70E+01	-15,3267	-1,70E+00
10	1,17E+01	-17,0267	2,87E+01
11	1,10E+01	11,6767	-7,00E-01
12	1,80E+01	10,9767	7,00E+00
13	-2,62E+00	17,9767	-2,06E+01
14	-3,62E+00	-2,6200	-1,00E+00
15	-3,20E-01	-3,6200	3,30E+00

Figura 43 – Gráfico de Durbin-Watson para TBHQ. **Figura 44** – Gráfico de Durbin Watson para BHT.

Nos gráficos das Figuras 43 e 44, porém, tal visualização não ficou simples de ser observada. Para BHT, o teste de homocedasticidade ainda era crítico para formalmente adotar o MMQO ou não para uma regressão linear. Para tal verificação, foi escolhido o teste de *Brown-Forsythe*, que avalia a variância dos resíduos com base na divisão em dois grupos e a dispersão em relação à mediana dos grupos¹²¹. Os dados obtidos neste teste para BHT estão na Tabela 22. Foi comprovada homocedasticidade, pois o valor p obtido (0,37) foi maior que o p crítico (0,05) para um nível de confiança de 95 %. Sendo assim, utilizou-se regressão pelo MMQO para BHT.

TABELA 22 – TESTE DE BROWN-FORSYTHE PARA BHT

e_{1j}	e_{2j}	$ d_1 $	$ d_2 $
4,67E+00	-1,70E+01	3,40E+00	1,67E+01
4,27E+00	1,17E+01	3,00E+00	1,20E+01
3,87E+00	1,10E+01	2,60E+00	1,13E+01
-6,30E-01	1,80E+01	1,90E+00	1,83E+01
1,47E+00	-2,62E+00	2,00E-01	2,30E+00
1,07E+00	-3,62E+00	2,00E-01	3,30E+00
-1,64E+01	-3,20E-01	1,77E+01	0,00E+00
-1,53E+01		1,66E+01	

Para TBHQ, os dados obtidos então foram utilizados em uma regressão por MMQP (Método dos Mínimos Quadrados Ponderado), ou seja, uma regressão ponderada, que leva em consideração o desvio-padrão de cada nível individualmente, e os níveis de menor desvio-padrão possuem maior contribuição para a obtenção dos coeficientes angular e linear da equação da regressão linear. A Figura 45 ilustra curva analítica obtida por essa regressão. As fórmulas para obtenção dos coeficientes a partir de MMQP assim como pelo MMQO se encontram em anexo a este trabalho. O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,9995, atendendo ao critério de aceitação, e para BHT, usando MMQO, foi o mesmo, e a curva analítica obtida encontra-se na Figura 45. As curvas limite de previsão superior (LPS) e inferior (LPI) também estão ilustradas. Estas foram utilizadas para cálculo dos limites de quantificação e detecção, conforme é discutido a seguir. Na figura 45, são ainda indicadas nos gráficos as posições do *centroide* e do *baricentro*. O primeiro corresponde ao ponto médio tanto para as variáveis de entrada do eixo x quanto para o ponto médio das respostas instrumentais (eixo y). Já o segundo corresponde ao ponto em teoria onde as curvas LPI e LPS mais se aproximam da curva analítica. Sua posição em relação ao eixo x é dada pela equação 2.

$$X_B = \frac{\sum w_i x_i}{\sum w_i} \quad (2)$$

Onde:

X_B é a posição do baricentro em relação ao eixo x.

x_i é a variável de entrada individual no eixo x.

w_i é dado pela equação 3.

$$w_i = \frac{1}{\left(\frac{s_{yi}}{\sqrt{p}}\right)^2} \quad (3)$$

Onde:

s_{yi} é o desvio-padrão da resposta instrumental em um nível.

p é o número de leituras de soluções de calibração por nível.

Figura 45 – Curva analítica obtida por MMQP para TBHQ.

Figura 46 – Curva analítica obtida por MMQO para BHT.

5.4.6 Limite de Detecção

Utilizou-se aqui método do cruzamento das curvas de previsão e analítica¹¹⁹. Este método está ilustrado na Figura 47. Na prática, a curva limite de previsão superior é prolongada até interceptar o eixo y. Este ponto é então rebatido na curva analítica, e o ponto obtido por esta operação no eixo x corresponde ao limite de detecção.

As curvas limites de previsão (CLP) e limite de confiança (CLC) são traçadas para verificação gráfica de quanto que a dispersão da resposta instrumental para cada padrão da curva analítica contribui para uma maior ou menor confiabilidade da regressão linear ao longo da faixa de trabalho.

Figura 47 – Utilização do método do cruzamento das curvas de previsão e analítica, para a obtenção dos limites de detecção e quantificação.

Quanto mais próximas da curva analítica graficamente, maior é a precisão dos dados obtidos experimentalmente. Considerando uma resposta instrumental que esteja acima do ponto do eixo y que é interceptado pela curva limite de previsão superior com 95 % de confiança, há apenas 2,5 % de chance desta resposta instrumental ser um branco ou um ruído¹¹⁹.

Para a obtenção das curvas limites de previsão, deve-se traçar uma regressão por MMQO entre as variáveis de entrada conhecidas no eixo x (no caso, massas de antioxidantes), e no eixo y devem ser usados valores calculados conforme equação 4.

$$Y_{PI} = y_{icalc} - t_{95\%;n-2} \times \sqrt{s_{res}^2 / (p + x_i^2 \times s_a^2 + 2x_i \times cov(a, b) + s_b^2)} \quad (4)$$

Onde:

Y_{PI} é o valor do ponto do eixo y na curva LPI.

y_{icalc} é a resposta instrumental estimada pela equação de regressão dos dados originais por MMQO.

$t_{95\%;n-2}$ é o t de student para 95 % de confiança e n-2 graus de liberdade.

n é o número de níveis da curva analítica (no caso, 5).

s_{res} é dado pela equação 5.

s_a é dado pela equação 6.

s_b é dado pela equação 7.

$cov(a,b)$ é a co-variância entre o coeficiente angular a e linear b da regressão linear.

$$s_{res} = \sqrt{\frac{m \times b^2 + \sum y_i^2 + a^2 \times \sum x_i^2 + 2ab \times \sum x_i - 2b \times \sum y_i - 2a \times \sum x_i y_i}{m-2}} \quad (5)$$

Onde:

m é o número de leituras totais (no caso, 15).

y_i é a resposta instrumental individual.

$$s_a = s_{res} \times \sqrt{m/S_{xx}} \quad (6)$$

Onde:

S_{xx} é dado pela equação 8.

$$s_b = s_{res} \times \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{S_{xx}}} \quad (7)$$

$$S_{xx} = m \times \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 \quad (8)$$

Para obtenção dos valores do eixo y da curva LPS, basta trocar o sinal de diferença da equação 4 pelo de soma. Já para a obtenção das curvas limites de confiança, deve-se traçar uma regressão por MMQO entre as

variáveis de entrada conhecidas no eixo x, assim como nas curvas LP, e no eixo y devem ser usados valores conforme equação 9.

$$Y_{CI} = y_{icalc} - t_{95\%,n-2} \times \sqrt{x_i^2 \times s_a^2 + 2x_i \times cov(a,b) + s_b^2} \quad (9)$$

Onde:

Y_{CI} é o valor do ponto do eixo y na curva LCI (Limite de Confiança Inferior).

Para obtenção dos valores do eixo y da curva LCS (Limite de Confiança Superior), basta trocar o sinal de diferença da equação 9 pelo de soma. Na literatura, usam-se as curvas LCS e LCI para cálculo de LD e LQ¹¹⁹. Porém, optou-se por utilizar as curvas LPI e LPS, por englobarem a variação da resposta instrumental da amostra. O uso de LPI e LPS conduzem a LD e LQ mais conservadores, com valores mais altos¹²².

Porém, como já exposto no item relativo à linearidade, para o antioxidante TBHQ foi realizada regressão segundo MMQP. Para esse tipo de regressão, o cálculo de LD e LQ sofre uma alteração, quando se usam curvas LP. Isso porque, como já comentado, é levada em conta a variação da resposta instrumental, e quando do uso de MMQP não se pode prever tal variação pela equação 4, simplesmente porque os coeficientes a e b da equação 2 são obtidos por MMQO. Sendo assim, é necessária outra previsão da variação da resposta instrumental, em função da variável de entrada do eixo x¹¹⁹. Para esta previsão, foi utilizada uma regressão polinomial entre o desvio-padrão das respostas instrumentais e as variáveis de entrada do eixo x, e com base na equação dessa regressão, é possível prever uma variação da resposta instrumental de amostra. A Figura 48 mostra o gráfico desta regressão para TBHQ.

Com base na equação de regressão do gráfico da Figura 48, pode-se utilizar a equação 10 para a obtenção de Y_{PI} .

$$Y_{PI} = y_{calc} - t_{95\%,n-2} \times \sqrt{(241,74x_i^4 - 520,75x_i^3 + 384,66x_i^2 - 111,82x_i + 11,01)^2 + s_a^2 \times x_i^2 + 2cov(a,b)x_i + s_b^2} \quad (10)$$

Figura 48 – Relação entre os desvios-padrão das áreas e a massa de antioxidante para TBHQ.

Como a regressão linear para a obtenção dos coeficientes angular e linear a e b é diferente, os parâmetros descritos nas equações de 4 a 9 consequentemente também são diferentes, e para uma regressão por MMQP são calculados conforme equações de 11 a 13.

$$s_a = \sqrt{\frac{\sum w_i}{S_{xx}}} \quad (11)$$

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum w_i x_i^2}{S_{xx}}} \quad (12)$$

$$S_{xx} = \sum w_i \times \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2 \quad (13)$$

Finalmente, aplicando-se o rebatimento ilustrado na Figura 47 para a obtenção do LD, para TBHQ, usando os valores evidenciados na Figura 45, tem-se o valor de 0,0054 mg de antioxidante. Considerando-se 100 mg de amostra, essa massa equivale a um biodiesel com 54 mg/kg de antioxidante TBHQ. Para BHT, usando os valores evidenciados na Figura 45, tem-se o valor

de 0,0268 mg de antioxidante. Com a mesma consideração, essa massa equivale a um biodiesel com 268 mg/kg de antioxidante BHT.

Após observar a considerável diferença entre os limites de detecção para BHT e TBHQ, considerou-se simular uma regressão de MMQO para TBHQ, com o intuito de verificar se tal diferença seria mantida. Feito isso, foi calculado um LD de 0,0239 mg de antioxidante. Logo, percebe-se que a mudança do modelo de regressão, de MMQO para MMQP influenciou consideravelmente nos levantamentos desses parâmetros de validação do método. De qualquer forma, a obtenção de LD para os dois antioxidantes satisfaz o critério de aceitação da Tabela 12, de $LD \leq 70\%$ do primeiro nível da curva analítica.

5.4.7 Limite de quantificação

Seguindo o mesmo método, o ponto encontrado no intercepto da curva LPS no eixo y, é rebatido desta vez na curva LPI, e o ponto obtido por esta operação no eixo x é o limite de quantificação. A Figura 47 ilustra a obtenção do limite de quantificação. Para TBHQ, foi calculado um LQ de 0,0108 mg de antioxidante e para BHT, um LQ de 0,0536 mg. Da mesma forma que no LD, foram levantados dados de LQ simulando uma regressão MMQO também para o TBHQ. A Tabela 23 traz um resumo dos resultados de LD_s e LQ_s calculados. Mesmo que a diferença observada entre os limites obtidos com uso de MMQP e uso de MMQO tenham se mostrado grandes, é interessante observar que em todos os casos o critério de aceitação foi satisfeito.

TABELA 23 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Parâmetros/antioxidantes	TBHQ	BHT	TBHQ com MMQO	Satisfaz critério de aceitação?
LD (mg)	0,0054	0,0268	0,0239	Sim
LQ (mg)	0,0108	0,0536	0,0478	Sim

Após levantamento desses parâmetros, amostras isentas de antioxidantes sintéticos foram fortificadas com os antioxidantes disponíveis em

níveis de concentração próximos aos limites propostos na Tabela 23, para a confirmação desses valores teóricos. Os resultados encontram-se na Tabela 24, já considerando uma massa de amostra de 100 mg, resultando em limites em mg/kg. Já a Tabela 25 informa as recuperações dos valores lidos em relação aos valores de fortificação, aqui sendo considerados como VVC (Valor Verdadeiro Convencional).

TABELA 24 – QUANTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS COM CONCENTRAÇÃO PRÓXIMA AO LD E AO LQ. CONCENTRAÇÕES EM mg/kg

Concentrações	Amostra 1 (Com TBHQ)	Amostra 2 (Com TBHQ)	Amostra 3 (Com BHT)	Amostra 4 (Com BHT)
LD teórico	54	54	268	268
Concentração de fortificação	60	62	195	289
Concentração de leitura	69	75	241	324
LQ teórico	108	108	536	536
Concentração de fortificação	125	98	494	554
Concentração de leitura	138	109	484	561

TABELA 25 – RECUPERAÇÕES PARA CONCENTRAÇÕES PRÓXIMAS AO LQ

Amostras	Valor obtido (mg/kg)	VVC	Recuperação em relação ao VVC
Amostra 1	138	125	110,4
Amostra 2	109	98	111,2
Amostra 3	484	494	98,0
Amostra 4	561	554	101,3

Utilizando o mesmo critério de aceitação do parâmetro de exatidão, foi verificado que os resultados obtidos pelas análises foram satisfatórios, mesmo trabalhando em uma faixa próxima ao LQ. Assim como o LD, os LQs obtidos

também satisfazem o critério de aceitação da Tabela 12, de $LQ \leq$ primeiro nível da curva analítica.

5.4.8 Sensibilidade

A Tabela 26 traz uma comparação entre os coeficientes angulares obtidos, pelas regressões lineares realizadas e aquelas disponíveis por método por CLAE⁸⁴.

TABELA 26 – COMPARAÇÃO DOS COEFICIENTES ANGULARES

Método	TBHQ	BHT
CLAE⁸⁴	5292,4	3052,3
Proposto	522,13	535,65

Mesmo verificando uma menor sensibilidade do método proposto em relação ao método por CLAE, deve-se observar que em tal método não foi trabalhada a mesma faixa de trabalho (no método por CLAE, a faixa vai de 80 a 400 mg/kg para TBHQ e 80 a 530 mg/kg para BHT)⁸⁴. Logo, a comparação da sensibilidade neste caso foi inconclusiva.

5.4.9 Seletividade

Este parâmetro foi avaliado de forma qualitativa, pois ao interpretarem-se os cromatogramas, verificou-se que os compostos de interesse não eluem na região do glicerol livre, e também não eluem na região dos ésteres, componentes majoritários do biodiesel, como ilustrado nas Figuras 37 a 39.

5.4.10 Estabilidade

Para a definição deste parâmetro, foram feitas injeções da mesma amostra ao longo do tempo a fim de se verificar quando havia uma variação de pelo menos 2 % da concentração medida. Após este período, uma nova curva

analítica deveria ser levantada. Como o método não utilizou padrão interno esperava-se que este período de estabilidade não fosse longo. A Tabela 27 traz os resultados obtidos para a definição deste parâmetro, assim como a figura 49, que traz o gráfico, que a partir do qual se estimou um valor máximo para a estabilidade. Os dados de Estabilidade demonstraram que, sem dúvida, com 24 horas após o tempo inicial, dever-se-ia reinjetar a curva analítica considerando o limite de variação de 2 %. Devido à limitação de tempo, optou-se por estimar o limite de 18 horas, conservadoramente.

TABELA 27 – ESTIMATIVA DA ESTABILIDADE

Tempo (horas)	0	2	4	6	10	24	30
Concentração (mg/kg)	2341	2352	2344	2355	2332	2288	2279

Figura 49 – A linha vermelha indica o limite de variação na estabilidade de 2 %; A linha verde indica o limite de estabilidade adotado conservadoramente.

5.4.11 Intervalo de aplicação

A definição deste parâmetro ficou definida como o intervalo entre o limite de quantificação e o último ponto da curva analítica. Isto implica em um intervalo entre 108 mg/kg e 8248 mg/kg, para o antioxidante TBHQ. Para BHT, o intervalo ficou entre 536 mg/kg e 8124 mg/kg.

5.5 Incerteza de medição

A incerteza de medição foi estimada com diretrizes do Guia *Eurachem:Citac Relacre*¹⁰⁹, que é um guia de estimativa de incertezas analíticas baseado no *ISO GUM Uncertainty Guide*¹⁰⁸, e no *Guia Eurachem: CITAC*¹⁰⁷ específico para ensaios químicos, e de divulgação européia. A etapa inicial do levantamento da incerteza de medição é a consideração de todas as fontes de incerteza (que, por definição, são desvios-padrão) passíveis de influenciar no resultado da medição, através do levantamento da *equação do mensurando* (equação 1, já mencionada no item 4.2.2) e posteriormente, do *diagrama de Ishikawa* (Figura 50).

$$C = \frac{m_{ant}}{m_{biod}} * 10^6 \quad (1)$$

Onde:

C é a concentração de antioxidante na amostra de biodiesel, em mg/kg.

m_{ant} é a massa de antioxidante, obtida pela regressão linear, em miligramas.

m_{biod} é a massa de biodiesel, obtida na pesagem, em miligramas.

Figura 50 – Diagrama de Ishikawa para a metodologia proposta LEGENDA. A: Regressão linear; B: Massa de amostra; C: Incerteza de uma pesagem, engloba resolução, calibração, deriva e excentricidade; D: Repetibilidade; E1 a E5: Padrões de calibração de 1 a 5; F: Combinação dos padrões de calibração; G: Massa de antioxidante para a preparação da solução estoque; H: Concentração da solução estoque de antioxidante; I: Volume de micropipeta; J: Volume do balão volumétrico; K: Calibração, deriva e repetibilidade do balão volumétrico; L: Resolução, calibração, deriva e repetibilidade de micropipeta.

As fontes de incerteza, conforme ilustradas no diagrama de Ishikawa, afetam direta ou indiretamente o resultado da medição. Aquelas que afetam diretamente (e estão apontadas para o eixo principal do diagrama) são a incerteza gerada pela regressão linear (que afeta m_{ant}); a incerteza da massa de biodiesel pesada (m_{biod}); a incerteza gerada pela repetibilidade da metodologia (afeta diretamente C); e a incerteza da preparação dos padrões de calibração (afeta m_{ant}). Esta última fonte de incerteza é largamente discutida entre as referências se realmente deve ser levada em consideração, pois existe o entendimento que esta já estaria englobada na incerteza gerada pela regressão linear. Neste trabalho, seguiu-se o exemplo do *Guia Eurachem Relacre*, onde considera-se a incerteza combinada dos padrões de calibração como uma componente à parte, apontando diretamente para o eixo principal do diagrama de Ishikawa.

As demais fontes de incerteza ilustradas no diagrama estão afetando indiretamente o resultado. As fontes de resolução, calibração, deriva e excentricidade são aplicáveis em todas as pesagens previstas na metodologia – na pesagem de amostra e também na pesagem do antioxidante concentrado para a preparação da solução estoque. Neste último caso, a pesagem afeta diretamente a massa de antioxidante (m_{antp}), conforme equação 14:

$$C_{est} = \frac{m_{antp}}{V_{bal}} \quad (14)$$

Onde:

C_{est} é a concentração da solução estoque, em mg/mL.

m_{antp} é a massa de antioxidante, obtida na pesagem, em mg.

V_{bal} é o volume do balão volumétrico utilizado, em mL.

As fontes de incerteza de calibração, deriva e repetibilidade do balão volumétrico afetam diretamente V_{bal} . Já C_{est} afeta diretamente a massa de antioxidante em cada solução-padrão, exemplificada como m_{pad1} na equação 15:

$$m_{pad1} = C_{est} * V_1 * 10^{-3} \quad (15)$$

Onde:

m_{pad1} é a massa de antioxidante referente ao padrão 1, em mg.

V_1 é o volume de solução estoque utilizado no padrão 1, em μL .

A relação descrita na equação 3 é a mesma para todas as cinco soluções de calibração. V_1 (assim como V_2 , V_3 , V_4 e V_5) é afetado diretamente pelas fontes de resolução, calibração, deriva e repetibilidade da micropipeta utilizada na medição deste volume.

Após o levantamento das fontes de incerteza, estas são então quantificadas e somadas, de acordo com a lei de soma de variâncias, onde se determinam as incertezas combinadas (equação 16):

$$u_c = \sqrt{\sum_{i=0}^n (u_n^2 c_n^2)} \quad (16)$$

Onde:

u_c é a incerteza combinada, que é a soma quadrática das outras incertezas.

u_n é a fonte de incerteza individual.

c_n é o coeficiente de sensibilidade relativo à fonte de incerteza u_n .

O coeficiente de sensibilidade é responsável pela correção das unidades durante o somatório das diferentes fontes de incerteza, além de conferir o devido peso àquela determinada fonte de incerteza. Ele é definido na equação 17. A utilização dos coeficientes de sensibilidade não é prevista no guia *Eurachem*¹⁰⁷, mas é fundamentada no *ISO GUM*¹⁰⁸.

$$c_n = \frac{\partial R}{\partial n} \quad (17)$$

Onde:

R é a grandeza que é afetada por n .

Um exemplo pode ser dado pela equação do mensurando no ensaio de índice de acidez de biodiesel¹²³:

$$I = (V_2 - V_1) * C_{KOH} * \frac{56,1}{W} \quad (18)$$

Onde:

I é índice de acidez da amostra, em mg de KOH por g;

V_2 é o volume de equivalência na titulação potenciométrica da amostra;

V_1 é o volume de equivalência na titulação potenciométrica do branco;

C_{KOH} é a concentração do titulante (hidróxido de potássio);

W é a massa de amostra.

Pela definição da equação 17, tem-se:

$$c_{CKOH} = \frac{\partial I}{\partial C_{KOH}} = (V_2 - V_1) * \frac{56,1}{W} \quad (19)$$

Onde:

c_{CKOH} é o *coeficiente de sensibilidade da concentração de hidróxido de potássio em relação ao índice de acidez*.

Com essas definições, as fontes de incerteza levantadas para a metodologia proposta puderam ser quantificadas e somadas. Inicialmente, o Quadro 1 traz o balanço de incerteza para as pesagens. O valor da incerteza de calibração foi retirado do certificado de calibração da balança; Para a resolução, considerou-se metade da menor medida (sendo uma balança analítica de 4 casas decimais de grama, a incerteza da resolução foi de 0,00005 g). Para a deriva da balança (que é definida como mudanças aleatórias que o instrumento pode apresentar após a calibração), considerou-se dividir a incerteza de calibração pelo fator de abrangência k ; A incerteza de excentricidade (incerteza gerada pelas diferentes posições dentro do prato da balança) também foi retirada do certificado de calibração. Destas fontes de incerteza, apenas a fonte de calibração tem distribuição de probabilidade normal (onde o divisor é 2,00), segundo o certificado de calibração. As demais têm distribuição de probabilidade dita retangular (onde o divisor é $\sqrt{3}$), e neste caso considera-se que a fonte de incerteza é aleatoriamente distribuída dentro do referido intervalo. Os coeficientes de sensibilidade assumem o valor numérico de 1,0 e -1,0. Como dentro da soma quadrática os coeficientes são elevados ao quadrado (equação 4), não há distinção numérica entre eles. Mas seus valores são resultados da aplicação da equação 5, ao se considerar que as massas registradas na balança são o resultado de uma operação de diferença, segundo a equação 20:

$$m = m_t - m_r \quad (20)$$

Onde:

m é a massa registrada na balança;

m_t é a massa total do sistema (amostra + recipiente);

m_r é a massa do recipiente (ou massa de tara).

Ao se aplicar a equação 5, facilmente percebe-se que $c_{mt} = 1,0$ e $c_{mr} = -1,0$.

Os graus de liberdade são ditos infinitos porque os valores não foram obtidos a partir de uma série de medidas (são incertezas do tipo B). Caso fossem definidos em uma série de medidas, seriam atribuídos valores iguais a $n - 1$, sendo n o número de medições realizadas (incerteza do tipo A).

Ao final de todos os balanços de incerteza, há o cálculo da *incerteza expandida* (U), que corresponde ao *intervalo de confiança* da medição (valor $\pm U$), para um certo grau de confiança. No presente trabalho optou-se por trabalhar sempre com um grau de 95 % de confiança (ou 5 % de significância). Para obter-se a incerteza expandida, utiliza-se a equação 21:

$$U = u_c * k \quad (21)$$

Onde:

U é a incerteza expandida;

k é o fator de abrangência, que neste trabalho correspondeu ao *t de student* para 95 % de confiança e ao número de graus de liberdade efetivos (v_{eff}). Este será abordado mais à frente;

u_c é definido na equação 16.

Quadro 1

ESTIMATIVA DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Código: FL-24
Revisão: 01
Emissão: 16/08/10
Página 1 de 1

PLANILHA

Ensaio	Valor de referência	Unidade
Determinação de antioxidantes em biodiesel - incerteza das massas	-	g

Símbolo	Fontes de Incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade ν_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
$u_{\text{res. balança}}$	incerteza devido à resolução da balança	0,00005	g	retangular	1,73	1,0000	-	0,000029	infinito	0,72
$u_{\text{calib. balança}}$	incerteza da calibração da balança	0,00010	g	normal	2,00	1,0000	-	0,000050	infinito	2,17
$u_{\text{deriva balança}}$	incerteza devido à deriva da balança	0,00005	g	retangular	1,73	1,0000	-	0,000029	infinito	0,72
$u_{\text{excentr. balança}}$	incerteza da excentricidade da balança	0,00040	g	retangular	1,73	1,0000	-	0,000231	infinito	46,38
$u_{\text{res. balança tara}}$	incert. devido à resolução da balança (tara)	0,00005	g	retangular	1,73	-1,0000	-	-0,000029	infinito	0,72
$u_{\text{calib. balança tara}}$	incerteza da calibração da balança (tara)	0,00010	g	normal	2,00	-1,0000	-	-0,000050	infinito	2,17
$u_{\text{deriva balança tara}}$	incerteza devido à deriva da balança (tara)	0,00005	g	retangular	1,73	-1,0000	-	-0,000029	infinito	0,72
$u_{\text{excentr. balança tara}}$	incert. da excentricidade da balança (tara)	0,00040	g	retangular	1,73	-1,0000	-	-0,000231	infinito	46,38

Incerteza padrão combinada (u_c)	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (ν_{eff})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade $\approx 95\%$)	Unidade
0,00034	normal	Infinito	2,00	0,00068	g

Quadro 2

ESTIMATIVA DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Código: FL-24
Revisão: 01
Emissão: 16/08/10
Página 1 de 1

PLANILHA

Ensaio						Valor de referência			Unidade	
Determinação de antioxidantes em biodiesel - volume do balão para solução estoque						25,0			mL	
Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade ν_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
$u_{\text{calibração}}$	incerteza de calibração do balão	0,00300	mL	normal	2,00	1,00	-	0,001500	infinito	30,75
$u_{\text{derivação}}$	incerteza de deriva do balão	0,00150	mL	retangular	1,73	1,00	-	0,000866	infinito	10,25
$u_{\text{repetição}}$	incerteza da repetitividade do volume do balão	0,00208	mL	normal	1,00	1,00	-	0,002078	9	59,00
Incerteza padrão combinada (u_c)	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (ν_{en})		Fator de abrangência (k)		Incerteza expandida (U) (Probabilidade $\approx$ 95%)		Unidade		
0,0027	normal	25		2,11		0,0057		mL		

O Quadro 2 apresenta o balanço de incerteza para o volume do balão. Ele é utilizado na preparação da solução estoque, estando diretamente relacionado com a concentração dessa solução (equação 14). As fontes de incerteza de calibração e deriva recebem tratativa semelhante à da balança; Mas neste caso há a inserção também da repetibilidade. Ela considera a variação que ocorre quando do preenchimento do balão, ou seja, variações ao redor do menisco. Para avaliar esta fonte de incerteza, realizou-se um ensaio de enchimento do balão dez vezes, com água destilada (que a 25 °C tem densidade conhecida). Cada uma das dez vezes era registrada a massa de água na balança, gerando os dados da Tabela 28. Após a conversão para volume, pela densidade, tirou-se o desvio-padrão para ser a fonte de incerteza relacionada à repetibilidade, considerada incerteza do tipo A.

TABELA 28 – REPETIBILIDADE DO PREENCHIMENTO DO BALÃO VOLUMÉTRICO

Replicata	Massa (g)	Conversão para volume (mL)
1	24,9525	24,9975
2	24,9573	25,0023
3	24,9577	25,0027
4	24,9548	24,9998
5	24,9542	24,9992
6	24,9544	24,9994
7	24,9526	24,9976
8	24,9522	24,9972
9	24,9525	24,9975
10	24,9521	24,9971
-	Desvio-padrão	0,00208

No Quadro 2 todos os coeficientes de sensibilidade tiveram o valor numérico 1,00, visto que todas as fontes de incerteza já estavam na unidade da incerteza combinada desejada (mL). Além disso, os graus de liberdade foram diferentes entre si - como a componente de repetibilidade foi uma fonte de incerteza do tipo A, apresentou um grau de liberdade individual de 9 (10 medições), enquanto que as outras fontes (do tipo B), têm grau de liberdade

infinito. Essa diferença influencia no grau de liberdade efetivo, conforme equação 22 (equação de Welch-Satterthwaite):

$$v_{eff} = u_c^4 / \sum_{i=0}^n \frac{(u_{ci})^4}{v_i} \quad (22)$$

Onde:

v_{eff} é o número de graus de liberdade efetivos;

v_i é o número de graus de liberdade individual, de cada fonte de incerteza.

Observando a equação 22, percebe-se que no caso de todos os graus de liberdade individuais forem infinitos, o somatório tenderá a zero, e o número de graus de liberdade efetivos será infinito. No caso do balanço de incerteza relativo ao volume do balão (Quadro 2), o valor de v_{eff} foi de 25, após a aplicação da equação 22, chegando-se a um fator de abrangência k de 2,11, para então se chegar à incerteza expandida. É importante observar que quando os cálculos de incerteza forneceram valores para serem usados em outros cálculos, a incerteza expandida é utilizada, e o divisor deve corresponder ao fator de abrangência específico. Por exemplo, a incerteza associada ao volume do balão volumétrico é utilizada no cálculo de incerteza relativo à concentração da solução estoque (Quadro 3). Ao se inserir na planilha de cálculo, a incerteza do volume do balão é tratada com distribuição normal, com divisor 2,11 (o fator de abrangência individual). Isso porque para que seja aplicada a equação 16, que combina as diferentes fontes de incerteza, todas as componentes devem estar no formato de um desvio-padrão. Isso também explica porque quando da inserção das incertezas do tipo A, a distribuição é considerada normal, e com divisor igual a 1,0 (o valor retirado diretamente das medições já é um desvio-padrão).

No cálculo de incerteza do Quadro 3 as fontes de incerteza correspondem às grandezas relacionadas na equação 14: a massa utilizada de antioxidante e o volume do balão. Os coeficientes de sensibilidade relativos a cada grandeza, devido à equação 14, terão valores diferentes, conforme cálculo abaixo:

$$c_{mantp} = \frac{\partial C_{est}}{\partial m_{antp}} = \frac{1}{V_{bal}} = \frac{1}{25} = 0,04 \text{ mL}^{-1} \quad (23)$$

Onde:

c_{mantp} é o coeficiente de sensibilidade relativo à massa de antioxidante obtida na pesagem.

$$c_{Vbal} = \frac{\partial C_{est}}{\partial V_{bal}} = -\frac{m_{antp}}{V_{bal}^2} = -\frac{206,2}{25^2} = -0,32992 \text{ mgmL}^{-2} \quad (24)$$

Onde:

c_{Vbal} é o coeficiente de sensibilidade relativo ao volume do balão volumétrico.

Os valores atribuídos à massa de antioxidante são de uma concentração de solução estoque de referência, de 8,248 mg/mL.

O Quadro 4 traz o cálculo de incerteza para o volume de solução estoque pipetado para a preparação das soluções de calibração. A diferença para o balanço do volume do balão volumétrico está na inserção da fonte relacionada à resolução, visto que é um instrumento digital, onde se seleciona manualmente o volume desejado. Para a resolução, a tratativa foi a mesma seguida para a balança. Já a repetibilidade teve a mesma tratativa do balão volumétrico: dez medições realizadas, com o mesmo volume selecionado, seguida de pesagem das massas de água, conversão para volume e cálculo do desvio-padrão (Tabela 29).

Quadro 3

ESTIMATIVA DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Código: FL-24
Revisão: 01
Emissão: 16/08/10
Página 1 de 1

PLANILHA

Ensaio						Valor de referência		Unidade		
Determinação de antioxidantes em biodiesel - concentração da solução estoque						8,248		mg/mL		
Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade ν_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
$u_{\text{massa antiox}}$	incert. de massa de antioxidante	0,00068	g	normal	2,00	0,04	mL^{-1}	0,000014	infinito	0,02
$u_{\text{vol. balão}}$	incerteza do volume do balão	0,00571	mL	normal	2,11	-0,32992	mgmL^{-2}	-0,000892	25	99,98
Incerteza padrão combinada (u_c)	Distribuição de probabilidade		Graus de liberdade (ν_{eff})		Fator de abrangência (k)		Incerteza expandida (U) (Probabilidade $\cong$ 95%)		Unidade	
0,0009	normal		25		2,11		0,0019		mg/mL	

Quadro 4

ESTIMATIVA DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO

PLANILHA

Código: FL-24
Revisão: 01
Emissão: 16/08/10
Página 1 de 1

Ensaio	Valor de referência	Unidade
Determinação de antioxidantes em biodiesel - volume pipetado de solução-estoque	20 a 100	μL

Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade ν_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
$u_{\text{calibração}}$	incerteza de calibração da pipeta	0,45000	μL	normal	2,87	1,00	-	0,156794	infinito	55,08
u_{derivado}	incerteza de deriva da pipeta	0,22500	μL	retangular	1,73	1,00	-	0,129904	infinito	37,81
$u_{\text{repetição}}$	incerteza da repetitividade da pipeta	0,04839	μL	normal	1,00	1,00	-	0,048392	9	5,25
$u_{\text{resolução}}$	incerteza de resolução da pipeta	0,05	μL	retangular	1,73	1,00	-	0,028868	infinito	1,87

Incerteza padrão combinada (u_c)	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (ν_{eff})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade $\approx 95\%$)	Unidade
0,2113	normal	3269	2,00	0,4225	μL

TABELA 29 – REPETIBILIDADE DE VOLUME DA MICROPIPETA

Replicata	Massa (g)	Conversão para volume (μL)
1	0,0998	99,9800
2	0,0998	99,9800
3	0,0999	100,0801
4	0,0998	99,9800
5	0,0999	100,0801
6	0,0998	99,9800
7	0,0998	99,9800
8	0,0998	99,9800
9	0,0999	100,0801
10	0,0998	99,9800
-	Desvio-padrão	0,04839

O Quadro 5 ilustra o balanço de incerteza para o padrão de calibração 1, ou seja, o ponto intermediário da curva analítica. Todas as demais massas de calibração seguiram o mesmo balanço de incerteza, baseado na equação 14, diferindo entre si apenas nos coeficientes de sensibilidade, conforme demonstrado abaixo:

$$c_{Cest} = \frac{\partial m_{pad1}}{\partial C_{est}} = V_1 * 10^{-3} = 20 * 10^{-3} = 0,02 \text{ mL} \quad (25)$$

Onde:

c_{Cest} é o coeficiente de sensibilidade relativo à concentração da solução estoque.

$$c_{V1} = \frac{\partial m_{pad1}}{\partial V_1} = C_{est} * 10^{-3} = 8,248 * 10^{-3} = 0,008248 \text{ g mL}^{-1} \quad (26)$$

Onde:

c_{V1} é o coeficiente de sensibilidade relativo ao volume de solução estoque utilizado no padrão 1.

Para os demais padrões, c_{V1} assume valor constante, pela sua dedução.

Já c_{Cest} substituindo-se os valores de 40, 60, 80 e 100 μL, obtêm-se:

$c_{Cest} = 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 \text{ mL}$, respectivamente para os padrões 2, 3, 4 e 5.

O Quadro 6 traz a planilha de combinação das incertezas das soluções de calibração, para enfim ser inserida na planilha da incerteza final (Quadro 7). Na incerteza final, ainda são inseridas as fontes relativas à repetibilidade, regressão linear e massa de amostra, conforme o Diagrama de Ishikawa indica.

Para a definição dos coeficientes de sensibilidade relativos ao balanço de incerteza final, levou-se em consideração a relação definida na equação 1:

$$c_{mant} = \frac{\partial C}{\partial m_{ant}} = \frac{1}{m_{biod}} * 10^6 = \frac{1}{100} * 10^6 = 10\,000 \, mg^{-1} \quad (27)$$

Onde:

c_{mant} é o coeficiente de sensibilidade relativo à massa de antioxidante.

$$c_{mbiod} = \frac{\partial C}{\partial m_{biod}} = -\frac{m_{ant}}{m_{biod}^2} * 10^6 = -\frac{0,17}{100^2} * 10^6 = -17 \, mg^{-1} \quad (28)$$

Onde:

c_{mbiod} é o coeficiente de sensibilidade relativo à massa de biodiesel.

A fonte de incerteza combinada dos padrões assumiu o mesmo coeficiente de sensibilidade da regressão linear por ambas se referirem à massa de antioxidante, obtida ao se obter o resultado da massa de antioxidante presente na amostra por intermédio da reta obtida na regressão linear. Um ensaio de repetibilidade do método forneceu os dados para o levantamento desta fonte de incerteza, e os resultados estão na Tabela 30. É importante observar que a consideração desta componente de incerteza de repetibilidade, não se sobrepõe, em princípio, às componentes de repetibilidades de volume de balão e micropipeta, visto que estas fontes de repetibilidade estão relacionadas à preparação dos padrões de calibração, e este ensaio de repetibilidade é para leituras de amostras, que conforme descrição do método, não passam pelo mesmo processo de preparação que as soluções de calibração.

Quadro 5

ESTIMATIVA DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Código: FL-24
Revisão: 01
Emissão: 16/08/10
Página 1 de 1

PLANILHA

Ensaio				Valor de referência		Unidade	
Determinação de antioxidantes em biodiesel - padrão 1				0,16496		mg	

Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade ν_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
$u_{\text{concestoque}}$	incerteza da concentração da solução estoque	0,00188	mg/mL	normal	2,00	0,02	mL	0,000019	25	0,01
$u_{\text{volume pipetado}}$	incerteza do volume pipetado de solução estoque	0,42254	μL	normal	2,00	0,008248	g/mL	0,001743	3269	99,99

Incerteza padrão combinada (u_c)	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (ν_{eff})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade $\approx 95\%$)	Unidade
0,0017	normal	3269	2,00	0,0035	mg

Quadro 6

ESTIMATIVA DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO

PLANILHA

Código: FL-24
Revisão: 01
Emissão: 16/08/10
Página 1 de 1

Ensaio	Valor de referência	Unidade
Determinação de antioxidantes em biodiesel - incerteza combinada dos padrões	0,16496 a 0,82480	mg

Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade ν_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
$u_{\text{padrão 1}}$	incerteza combinada do padrão 1	0,0035	mg	normal	2,000	1,00	-	0,001743	3269	19,98
$u_{\text{padrão 2}}$	incerteza combinada do padrão 2	0,0035	mg	normal	2,000	1,00	-	0,001743	3271	19,99
$u_{\text{padrão 3}}$	incerteza combinada do padrão 3	0,0035	mg	normal	2,000	1,00	-	0,001743	3274	20,00
$u_{\text{padrão 4}}$	incerteza combinada do padrão 4	0,0035	mg	normal	2,000	1,00	-	0,001744	3278	20,01
$u_{\text{padrão 5}}$	incerteza combinada do padrão 5	0,0035	mg	normal	2,000	1,00	-	0,001745	3283	20,03

Incerteza padrão combinada (u_c)	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (ν_{eff})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade $\cong 95\%$)	Unidade
0,0039	normal	16374	2,00	0,0078	mg

Quadro 7

ESTIMATIVA DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Código: FL-24
Revisão: 01
Emissão: 16/08/10
Página 1 de 1

PLANILHA

Ensaio	Valor de referência	Unidade
Determinação de antioxidantes em biodiesel - incerteza final	1700,0	mg/kg

Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i		Incerteza padrão u_i	Graus de liberdade ν_i	Porcentagem de contribuição
	Nome	Valor (+/-)	Unidade			Valor	Unidade			
u_{curva}	incerteza da massa obtida na regressão linear	0,00223	mg	normal	1,000	10000	mg^{-1}	22,340000	infinito	21,25
$u_{\text{massa biodiesel}}$	incerteza da massa de amostra de biodiesel	0,67823	mg	normal	2,000	-17,0	mg^{-1}	-5,764980	infinito	1,41
$u_{\text{padrões}}$	incerteza combinada padrões de calibração	0,0078	mg	normal	2,000	10000	mg^{-1}	38,987241	16374	64,71
u_{repe}	incerteza devido à repetibilidade	17,220	mg/kg	normal	1,000	1,00	-	17,220000	9	12,62

Incerteza padrão combinada (u_c)	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (ν_{eff})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade $\approx 95\%$)	Unidade
48,4649	normal	556	2,00	96,9297	mg/kg

TABELA 30 – ENSAIO DE REPETIBILIDADE

Replicata	Concentração (mg/kg)
1	4833,6
2	4852,2
3	4829,8
4	4816,7
5	4857,8
6	4850,4
7	4846,6
8	4861,6
9	4854,1
10	4876,5
Desvio-padrão	17,22

Para a incerteza da regressão linear, a equação 29 é prevista no guia de incertezas analíticas:

$$u_{curva} = \frac{S_y}{b} * \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_{lid} - \bar{y})^2}{b^2 * \sum_{i=0}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (29)$$

Onde:

S_y é o desvio-padrão associado à massa de antioxidante;

b é o coeficiente angular da reta de calibração;

N é o número de padrões utilizados no traçado da curva analítica;

n é o número de replicatas da amostra;

y_{lid} é o valor da área do pico de interesse na amostra;

$\bar{y}$ é o valor médio das áreas de pico de interesse nos padrões de calibração;

x_i é a massa de antioxidante em uma solução de calibração;

$\bar{x}$ é o valor médio das massas de antioxidante entre as soluções de calibração.

Na literatura, tem-se a dedução da equação 29, que em linhas gerais, estabelece relação matemática direta para a obtenção da incerteza gerada pela regressão linear, que corresponde à combinação das incertezas dos coeficientes

angular e linear da reta obtida na regressão, e da correlação entre eles, e também da incerteza gerada no sinal instrumental, no caso da metodologia proposta, área dos picos de interesse.

Porém, Miller¹²⁴ discute esta equação e a detalha como uma aproximação, na verdade, e propõem outra equação, que foi utilizada neste trabalho para o cálculo da incerteza gerada pela regressão linear (equação 30):

$$u_{curva} = \sqrt{\frac{\frac{s_{res}^2}{n} + x^2 * s_a^2 + 2xcov(a,b) + s_b^2}{b^2}} \quad (30)$$

Onde:

s_{res} é dado pela equação 5;

x é o valor de massa de antioxidante presente na amostra obtido pela equação da reta de regressão;

s_a é dado pela equação 6;

s_b é dado pela equação 7.

Quando a regressão é feita pelo MMQP, s_{res} é obtido pela estimativa de desvio-padrão da amostra a partir da regressão polinomial entre os desvios-padrão de resposta instrumental e níveis da curva analítica (Figura 47). Já s_a e s_b são obtidos pelas equações 11 e 12, respectivamente.

Para as estimativas de incerteza, considerou-se $n = 1$, prevendo a injeção da amostra em apenas uma replicata, considerando-se assim o pior caso para a incerteza analítica. Logo, a equação 31 descreveu a obtenção de s_{res} para a regressão pelo MMQP para determinação de antioxidante TBHQ.

$$s_{res} = (241,74x^4 - 520,75x^3 + 384,66x^2 - 111,82x + 11,01)/\sqrt{n} \quad (31)$$

Já a incerteza relativa à massa de amostra, também inserida no balanço da incerteza final, foi retirada do mesmo balanço do Quadro 1, que corresponde à incerteza de uma pesagem com a balança utilizada no procedimentos.

A Figura 51 traz um gráfico que correlaciona a incerteza de medição levantada em função da concentração de antioxidante determinada pela metodologia, dentro do intervalo de aplicação para TBHQ (considerando regressão linear pelo MMQO). Cabe destacar que todos os cálculos de incerteza ilustrados usaram como valor de referência uma concentração de 1700 mg/kg. Esta concentração foi escolhida como referência porque foi uma concentração intermediária para o conjunto de amostras utilizado para verificação da aplicabilidade do método proposto (detalhes a seguir). Devido à boa correlação da função ilustrada na Figura 51, todo o cálculo de incerteza individual pode, em tese, ser substituído pela obtenção da incerteza expandida diretamente por esta função.

Figura 51 – Regressão de segundo grau entre a incerteza expandida e o valor da concentração de antioxidante nas amostras utilizadas para verificação da aplicabilidade do método.

Através da relação evidenciada na Figura 51, é possível estimar o ponto de menor incerteza da metodologia, como segue abaixo:

$$U = 7 * 10^{-7} C^2 - 0,0068C + 186,13 \quad (32)$$

$$\frac{\partial U}{\partial C} = 14 * 10^{-7} C - 0,0068 = 0 \text{ (ponto mínimo)}. \quad (33)$$

$$C = \frac{0,0068}{14 * 10^{-7}} = 4857,1 \text{ mg/kg} \quad (34)$$

Como esperado, o ponto de menor incerteza localiza-se próximo ao centro da curva analítica. Porém, a maior parte das amostras desconhecidas situou-se entre 900 e 2500 mg/kg, ou seja, em um intervalo onde a incerteza expandida fica entre 180 e 174 mg/kg, em números relativos, entre 20 % e 7 %.

As Figuras 52 e 53 apresentam a mesma relação, para TBHQ com regressão pelo MMQP (regressão de fato considerada para TBHQ) e para BHT, respectivamente.

Figura 52 – Regressão de quarto grau entre a incerteza expandida e o valor da concentração de antioxidante TBHQ nas amostras utilizadas para verificação da aplicabilidade do método.

Figura 53 – Regressão de segundo grau entre a incerteza expandida e o valor da concentração de antioxidante BHT nas amostras utilizadas para verificação da aplicabilidade do método.

As equações 35 a 37 representam a obtenção de concentração quando da incerteza expandida mínima para determinação de BHT, da mesma forma como obtido para determinação de TBHQ com regressão pelo MMQO.

$$U = 8 * 10^{-7} C^2 - 0,0081C + 204,42 \quad (35)$$

$$\frac{\partial U}{\partial C} = 16 * 10^{-7} C - 0,0081 = 0 \text{ (ponto mínimo)}. \quad (36)$$

$$C = \frac{0,0081}{16 * 10^{-7}} = 5062,5 \text{ mg/kg} \quad (37)$$

Entretanto, para TBHQ com regressão pelo MMQP, não foi possível estabelecer uma função polinomial até quarto grau confiável entre a concentração e a incerteza expandida a partir de dados obtidos experimentalmente. Logo, a estimativa de incerteza para a determinação de TBHQ pelo MMQP apresentou a vantagem de obtenção de menores valores de incerteza – fato evidenciado pelos dados das Tabelas 31 e 32. A necessidade, porém, de se estimar a incerteza individualmente para cada amostra, sem a facilidade de utilização de uma função previamente estabelecida, é uma desvantagem. Por meio dos dados, foi observado que as regiões de menor

incerteza expandida foram entre 2000 e 3000 mg/kg, e entre 7500 e 8000 mg/kg. Para determinação de TBHQ pelo MMQO, foi possível, pela função obtida (Figura 51), a estimativa do ponto de menor incerteza (4857 mg/kg). Isso demonstra a clara diferença em se trabalhar com regressão pelo MMQP e pelo MMQO, além das diferenças observadas quando do levantamento de LD e LQ. Como a maior parte das amostras comerciais encontra-se em uma faixa de concentração de até 2500 mg/kg, pode-se inferir que de fato, a utilização de MMQP na regressão linear é mais indicada para a determinação de TBHQ que o uso de MMQO.

Os valores de incerteza de medição expandida de determinação de antioxidante TBHQ para as amostras analisadas pelo método proposto variaram de 236 mg/kg em uma concentração de 584 mg/kg a 87 mg/kg em uma concentração de 7825 mg/kg, o que traduz uma variação de 40 % a 1 % de incerteza expandida relativa para determinação de antioxidante TBHQ. Já para BHT os valores variaram de 198 mg/kg em uma concentração de 777 mg/kg a 167 mg/kg em uma concentração de 4895 mg/kg, o que traduz uma variação de 25 % a 3 % de incerteza expandida relativa para determinação de antioxidante BHT.

O fato de não ser possível estabelecer uma função confiável entre a incerteza expandida e a concentração obtida na determinação de antioxidante TBHQ quando do uso do MMQP, pode estar relacionado com o detalhe de haver mais fontes de incerteza no cálculo final (Quadro 7). A menor incerteza de regressão linear gerada pelo uso do MMQP deixou aparentemente a incerteza expandida final mais sensível aos valores de incerteza das outras fontes, como repetibilidade, padrões de calibração e massa de amostra. Essa maior sensibilidade às outras fontes também parece ter contribuído para a maior variação de incerteza expandida relativa quando da determinação de TBHQ.

5.6 Aplicabilidade do método

Após validação do método, este foi aplicado em amostras comerciais, devidamente especificadas – atenção especial foi concedida acerca do teor de água das amostras, devido à influência verificada no item 3 – com o intuito de se obter informações acerca do desempenho dos antioxidantes BHT e TBHQ, a fim de se confirmar o que a literatura tem reportado, quando usados em biodiesel. A estabilidade

à oxidação foi medida utilizando-se o método Rancimat¹⁶. A Tabela 31 traz os resultados mais relevantes, e as Figuras 54 e 55 expõem a relação gráfica entre os resultados. Os parâmetros de qualidade de algumas amostras comerciais utilizadas, mostrando que atendem a especificação da ANP, encontram-se em anexo a este trabalho.

TABELA 31 – RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO E DE ESTABILIDADE À OXIDAÇÃO

Amostra / matéria-prima	Concentração de TBHQ (mg/kg)	Concentração de BHT (mg/kg)	Estabilidade à oxidação* (h)
Soja	845 ± 171	-	4,33 ± 0,59
Soja	-	1244 ± 179	5,52 ± 0,59
Gordura animal	-	-	9,16 ± 0,59
Soja / Gordura animal	-	-	6,87 ± 0,59
Soja	1955 ± 87	-	8,87 ± 0,59
Soja	1332 ± 108	-	7,79 ± 0,59
Soja	-	998 ± 180	4,98 ± 0,59
Soja	-	852 ± 181	4,61 ± 0,59
Soja	-	1008 ± 180	5,36 ± 0,59
Soja	952 ± 152	-	6,24 ± 0,59
Soja / Gordura animal	-	-	11,02 ± 0,59

(*)A estimativa de incerteza de medição do ensaio Rancimat (Estabilidade à oxidação a 110 °C) foi estimada em estudo realizado em paralelo ao desenvolvimento da metodologia proposta, e este estudo é relatado em anexo.

Como se pode observar nas Figuras 54 e 55, o TBHQ apresenta melhor desempenho, pois uma menor concentração deste antioxidante mostrou-se necessária para adequação das amostras à especificação da ANP, em relação ao BHT.

Figura 54 – Concentração encontrada de TBHQ em amostras comerciais e suas respectivas Estabilidades à Oxidação, conforme Tabela 31. Observa-se que uma concentração de TBHQ próxima a 1000 mg/kg tem sido suficiente para a adequação deste conjunto de amostras à especificação da ANP.

Figura 55 – Concentração encontrada de BHT em amostras comerciais e suas respectivas Estabilidades à Oxidação, conforme Tabela 31. Observa-se que uma concentração de BHT próxima a 1000 mg/kg não tem sido suficiente para a adequação deste conjunto de amostras à especificação da ANP, ao contrário do TBHQ.

Estes resultados estão de acordo com o que é sugerido na literatura⁷⁶⁻⁸¹. A Tabela 31 também evidencia que nas amostras de biodiesel de origem dupla (soja e gordura animal), não se encontrou teor de antioxidantes. Isso de certa forma era esperado, visto que, a composição mais saturada dos ésteres presentes na gordura animal, torna o produto menos susceptível à oxidação, não necessitando assim de antioxidante para adequação à especificação da ANP. A Tabela 32 traz mais resultados obtidos pelo método proposto em amostras comerciais.

TABELA 32 – RESULTADOS

Amostra / matéria-prima	Concentração de TBHQ (mg/kg)	Concentração de BHT (mg/kg)
Soja	1537 ± 92	-
Soja	-	1805 ± 190
Gordura animal	-	-
Soja / Gordura animal	-	-
Soja	1698 ± 91	-
Soja	1147 ± 136	-
Soja	-	1988 ± 189
Soja	-	820 ± 198
Soja	-	777 ± 198
Soja	884 ± 166	-
Soja / Gordura animal	584 ± 236	-
Soja	8224 ± 89	-
Soja	7825 ± 87	-
Girassol	7116 ± 88	-
Soja	6925 ± 90	-
Soja	-	1845 ± 190
Soja	-	2254 ± 187
Soja	6304 ± 95	-
Soja	5518 ± 99	-

TABELA 32 – RESULTADOS (continuação)

Amostra / matéria-prima	Concentração de TBHQ (mg/kg)	Concentração de BHT (mg/kg)
Soja	5049 ± 99	-
Girassol	4620 ± 96	-
Soja	4015 ± 91	-
Soja	3526 ± 87	-
Soja	2882 ± 87	-
Soja	2440 ± 87	-
Soja	2125 ± 87	-
Soja	1897 ± 88	-
Soja	1661 ± 92	-
Soja	-	2005 ± 189
Soja	-	1227 ± 195
Soja	-	3325 ± 178
Soja	-	4895 ± 167
Soja	-	7662 ± 189

As figuras 56 e 57 ilustram cromatogramas obtidos para algumas amostras citadas na tabela 32.

Figura 56 – Cromatogramas na região do pico de TBHQ de amostras quantificadas com 6925, 2882, 1537 e 1147 mg/kg, respectivamente em azul, vermelho, verde e rosa.

Figura 57 – Cromatogramas na região do pico de BHT de amostras quantificadas com 3325, 2254, 1227 e 820 mg/kg, respectivamente em rosa, verde, vermelho e azul.

6. CONCLUSÃO

Para uma melhor compreensão do processo de oxidação do biodiesel, vários estudos têm sido realizados, e uma das ferramentas auxiliares a esses estudos está em fase de desenvolvimento, que trata justamente da determinação quantitativa de antioxidantes sintéticos. Apesar dos esforços empregados, ainda não há método analítico difundido e largamente empregado junto aos agentes econômicos envolvidos na cadeia do biodiesel. Além disso, existe uma carência de informações sobre a estabilidade e o efeito dos antioxidantes sintéticos em função de sua concentração, e esta carência pode se tornar crítica ao mercado, visto que dentro da logística nacional, é possível que o biodiesel fique até 6 meses armazenado nas mais variadas condições, após certificado pelo produtor e antes de ser misturado ao óleo diesel, para então ser de fato consumido.

Mesmo diante de tal carência, resultados principalmente sobre o desempenho dos antioxidantes sintéticos foram obtidos e disponibilizados, apontando para um melhor desempenho do TBHQ, dentre os antioxidantes mais utilizados na indústria do biodiesel.

As técnicas cromatográficas apresentam propriedades favoráveis para o desenvolvimento de métodos para determinação de antioxidantes, tais como: por ser uma técnica de separação, a possibilidade de amostras apresentarem efeito de matriz é muito pequena, devido à diferença da natureza entre os analitos e a matriz, neste caso; o uso de um detector suficientemente sensível e estável para as determinações (ionização por chama); são técnicas já conhecidas por parte dos agentes envolvidos na cadeia do biodiesel. Pode-se dizer que este estudo possibilitou não somente o desenvolvimento de um método para a determinação quantitativa de antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT, tais como são utilizados nas usinas produtoras, mas também a aplicação de conceitos que fazem cumprir requisitos de qualidade previstos nas normas vigentes sobre o assunto. Tais requisitos são reconhecidos internacionalmente, e a adoção de sistemas de qualidade com foco nesses requisitos, por parte de laboratórios de certificação de produtos, é notoriamente crescente ano a ano, evidenciada também devido a exigências em nível governamental.

A partir da metodologia desenvolvida e proposta, chegou-se às seguintes conclusões:

- a) Foi desenvolvida nova metodologia para a determinação de antioxidantes sintéticos em biodiesel, utilizando cromatografia em fase gasosa, com detector de ionização por chama e injetor *on-column*.
- b) Esta metodologia foi otimizada, quando foi verificada limitação imposta pelo teor de água da amostra de biodiesel, quando acima de 500 mg/kg de água. Cabe a observação de que a especificação atualmente está em mudança corrente, alterando-se o valor máximo permitido de 350 mg/kg para 200 mg/kg de água ao fim do presente ano. Isto, em princípio, favorece a implantação da metodologia, principalmente por parte de laboratórios de certificação de biodiesel (inclusive dos próprios produtores de biodiesel), que em geral já possuem a instrumentação e reagentes / padrões necessários, e que então podem realizar estudos de estabilidade, monitorando a concentração de antioxidante.
- c) A metodologia foi validada segundo parâmetros internacionais para antioxidantes que tem sua composição majoritariamente constituída de TBHQ e BHT, que hoje são os mais utilizados no país.
- d) Durante a validação, foram aplicados diferentes conceitos para o levantamento dos parâmetros do protocolo, mesclando ferramentas estatísticas disponíveis, diferentes daquelas convencionalmente adotadas. Isto possibilitou principalmente a obtenção de bons limites de detecção e quantificação.
- e) Também durante a validação, foi possível a comparação entre o modelo clássico de regressão linear (MMQO) e outro modelo (MMQP), que em um dos casos, demonstrou ser mais adequado. Esta comparação apontou diferenças significativas quando da adoção dos diferentes modelos. Essas diferenças observadas não eram esperadas no início do estudo.
- f) Como parte da validação, foi estimada a incerteza de medição, que é um dos requisitos obrigatórios nos sistemas de qualidade que se baseiam na NBR ISO IEC 17025:2005. Foi possível também, em um dos casos, estimar como a incerteza de medição se comporta ao longo da faixa de trabalho da metodologia. O uso do MMQP contribuiu também de forma significativa para a redução dos valores de incerteza de medição, e novamente isso não era esperado.

- g) A metodologia, como concebida, possui maior aplicabilidade para biodiesel de soja ou de composição parecida (girassol, canola, dentre outros), visto que, como esperado, o biodiesel com predominância de cadeias carbônicas saturadas (ex: gordura animal) já atende a especificação da ANP quanto à estabilidade sem a necessidade da adição de antioxidantes. Os resultados da Tabela 31 confirmam dados da ANP em que foi observado que produtores que trabalham com gordura animal não têm relatado uso de antioxidantes. Estes resultados ainda demonstram a aplicabilidade da metodologia, podendo-se utilizá-la no sentido de se buscar um valor mínimo de determinado antioxidante necessário para a adequação de um lote de biodiesel à especificação da ANP, sem a necessidade de se gerar vários lotes, para um levantamento de tentativa e erro.

Há também outra carência de informações, esta acerca do impacto ambiental decorrente do uso desses produtos na indústria do biodiesel. Tais produtos já são alvo de controle na indústria alimentícia, e o uso em uma indústria de combustível não chama atenção, à primeira vista, com respeito ao impacto ambiental. Porém, devido à localização das usinas produtoras, sempre próximas a unidades produtoras de grãos (algumas, inclusive, dividindo parque industrial), o passivo ambiental carece de ser melhor estudado, e a metodologia aqui proposta pode ser ferramenta a contribuir nesse sentido.

Como continuidade para este trabalho, propõe-se a realização de testes com a metodologia em diferentes usinas produtoras e em diferentes agentes econômicos da cadeia do biodiesel (distribuidoras, por exemplo). Também pode ser proposta a validação interlaboratorial da metodologia, desde que um número adequado de laboratórios venha a adotá-la e implantá-la. Aperfeiçoamentos naturalmente também podem vir a ser propostos, como por exemplo, novas faixas de trabalho (sempre com a devida atenção de não se trabalhar próximo aos limites da técnica), a ampliação do escopo para outros antioxidantes sintéticos, e o uso de válvulas de reversão de fluxo, dependendo dos tempos de retenção de interesse, para agilizar a análise.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KNOTHE, G; VAN GERPEN, J; KRAHL, J; RAMOS, LP. The Biodiesel Handbook, first edition, AOCS Press, Champaign, IL, 2005.
2. LANE, JC. Gasoline and Other Motor Fuels, em *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 3ª edição, vol. 11, John Wiley & Sons, New York, NY, pp. 682-698, 1980.
3. VAN GERPEN, J; REITZ, R. Diesel Combustion and Fuels, em *Diesel Engine Reference Book*, Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, pp. 89-104, 1998.
4. PUCKETT, AD; CAUDLE, BH. U.S. Bur. Mines, Inform Circ. Nº 7474, 14 pp., 1948.
5. CLOTHIER, PQE; AGUDA, BD; MOISE A; PRITCHARD, H. *Chem. Soc. Rev.*: 22, 101 (1993).
6. LODOMMATOS, N; PARSI, M; KNOWLES, A. *Fuel*: 75, 8-14 (1996).
7. MCCORNICK, RL; GRABOSKI, MS; ALLEMAN, TL; HERRING, AM. *Environ. Sci. Technol.*: 35, 1742-1747 (2001).
8. XIN, J; IMAHARA, H; SAKA, S. *Fuel*: 88, 282-286 (2009).
9. KNOTHE, G; MATHEAUS, AC; RYAN III, TW. *Fuel*: 82, 971-975 (2003).
10. FREEDMAN, B; BAGBY, MO. *J. Am. Oil Chem. Soc.*: 67, 565-571 (1990).
11. KNOTHE, G; BAGBY, MO; RYAN III, TW. *J. Am. Oil Chem. Soc.*: 75, 1007-1013 (1998).
12. BS EN 14213:2003. *Heating Fuels. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Requirements and Test Methods*. European Standard.
13. BS EN 14214:2008. *Automotive Fuels. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Requirements and Test Methods*. European Standard.
14. Resolução ANP 14, D.O.U. 18.05.2012.
15. ASTM D6751-12. *Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels*.
16. BS EN 14112:2003. *Fat and Oil Derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test)*. European Standard.

17. Dados *Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis*, 2º semestre de 2011.
18. Resolução CNPE 06, D.O.U. 26.10.2009.
19. RAMALHO, VC; JORGE, N. *Quím. Nova*: 29, 755-760 (2006).
20. Resolução ANP 46, D.O.U. 12.09.2011.
21. ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Norma Brasileira*.
22. GERIS, R; DOS SANTOS, AC; AMARAL, BA; MAIA, IS; CASTRO, VD; CARVALHO, JRM. *Química Nova*: 30,5, 1369-1373 (2007).
23. BONDIOLI, P. *Topics In Catalysis*: 27, 77-82 (2004).
24. HOYDONCKX, HE; *Topics in Catalysis*: 27, 83-96 (2004).
25. SHAH, S; SHARMA, S; GUPTA, MN. *Indian J. Biochem. Biophys.*: 40, 392-399 (2003).
26. FUKUDA, H; KONDO, A; NODA, H. *J. Biosci. Bioeng.*: 92, 405-416 (2001).
27. SCHUCHARDT, U; SERCHELI, R; VARGAS, RM. *J. Braz. Chem. Soc.*: 9, 199-210 (1998).
28. CANAKCI, M; VAN GERPEN, J. *Trans. ASAE*: 42, 1203-1210 (1999).
29. FREEDMAN, B; BUTTERFIELD, RO; PRYDE, EH. *J. Am. Oil Chem. Soc.*: 63, 1375-1380 (1986).
30. BOOCOCK, DGB; KONAR, SK; MAO, V; SIDI, H. *Biomass Bioenergy*: 11, 43-50 (1996).
31. BOOCOCK, DGB; KONAR, SK; MAO, V; LEE, C; BULIGAN, S. *J. Am. Oil Chem. Soc.*: 75, 1167-1172 (1998).
32. KOMERS, K; STLOUKAL, J; MACHECK, J; SKOPAL, F. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*: 103, 359-362 (2001).
33. STIDHAM, WD; SEAMAN, DW; DANZER, MF. "Method for Preparing a Lower Alkyl Ester Product from Vegetable Oil", Patente dos E.U.A. nº 6 127 560 (2000).
34. WIMMER, T. "Process for the Production of Fatty Acid Esters of Lower Alcohols", Patente dos E.U.A. nº 5 399 731 (2005).
35. MITTELBAACH, M; KONCAR, M. "Method for the Preparation of Fatty Acid Alkyl Esters". Patente dos E.U.A. nº 5 849 939 (1998).
36. *White Paper on Internationally Compatible Biofuel Standards*. ISO (2009).
37. Lei nº 11.097, D.O.U. 14.01.2005.

38. Disponível em
<http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/programa/historico.html>
39. Decreto nº 5.297, D.O.U. 06.12.2004.
40. Resolução BNDES nº 1.135, D.O.U. 03.12.2004.
41. Portaria MME 43, D.O.U. 03.10.2005.
42. *Anuário Estatístico ANP* (2006).
43. *Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis, Ministério das Minas e Energia*, 61 (2013).
44. Apresentação COPPEComb – *Utilização de biodiesel parafrínico em bases do Sindicom*, profa. Beatriz Maria Cohen Chaves, Grupo de Trabalho ANP (2008).
45. ABNT NBR 15512-2008. *Armazenamento, transporte, abastecimento e controle de qualidade de biodiesel e/ou mistura óleo diesel/biodiesel*.
46. Manuseio e armazenamento de óleo diesel B. Disponível em
<http://www.anp.gov.br/?id=472>
47. HOED, VV; ZYAYKINA, N; GREYT, WD; MAES, J; VERHÉ, R; DEMEESTERE, K. *J. A. Oil Chem. Soc.*: 85, 701-709, 2008.
48. TANG, H; RHET, C; DE GUZMAN, C; SALLEY, SO; NG, KYS. *J. Am. Oil Chem. Soc.*: 85, 1173-1182 (2008).
49. TANG, H; SALLEY, SO; NG, KYS. *Fuel*: 87, 3006-3017 (2008).
50. Resolução CONAMA 403, D.O.U. 11.11.2008.
51. Resolução ANP 46, D.O.U. 27.12.2012.
52. *Anais do 5º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel*, Salvador, 2012.
53. FREEDMAN, B; BAGBY, MO. *J. Am. Oil Chem. Soc.*: 66, 1601-1605 (1989).
54. HARRINGTON, KJ. *Biomass*: 9, 1-17 (1986).
55. FREEDMAN, B; BAGBY, MO; CALLAHAN, TJ; RYAN III, TW. *Cetane Numbers of Fatty Esters, Fatty Alcohols and Triglycerides Determined in a Constant Volume Combustion Bomb*. SAE Technical Pap. Ser. 900343, SAE, Warrendale, PA, 9 pp., 1990.
56. SOBOTOWSKI, RA; WALL, JC; HOBBS, CH; MATHEAUS, AC; MASON, RL; RYAN III, TW; PASSAVANT, GW; BOND, TJ. EPA HDEWG Program – Test Fuel Development, em *Diesel and Gasoline Performance and Additives (SAE Special Publication SP-1551)*, 2001.

57. MATHEAUS, AC; SOBOTOWSKI, RA; WALL, JC; HOBBS, CH; NEELY, GD; RYAN III, TW; PASSAVANT, GW; BOND, TJ. EPA HDEWG Program – Engine Test Results, em *Diesel and Gasoline Performance and Additives (SAE Special Publication SP-1551)*, 2001.
58. ASTM D7545-09. *Standard Test Method for Oxidation Stability of Middle Distillate Fuels – Rapid Small Scale Oxidation Test*.
59. PARK, JY; KIM, DK; LEE, JP; PARK, SC; KIM, YJ; LEE, JS. *Bioresource Technology*: 99, 1196-1203 (2008).
60. MCCORNICK, RL; WESTBROOK, SR. *Empirical Study of the Stability of Biodiesel and Biodiesel Blends*. Milestone Report, 2007.
61. Disponível em
http://www.carbio.com.ar/es/index.php?con=bio_legislacion
62. ASTM D7467-10. *Standard Specification for Diesel Fuel Oil, Biodiesel Blend (B6 to B20)*.
63. BS EN 15751:2009. *Automotive fuels - Fatty acid methyl ester (FAME) fuel and blends with diesel fuel - Determination of oxidation stability by accelerated oxidation method*. European Standard.
64. RYAN III, TW; STAPPER, B. *Diesel Fuel Ignition Quality as Determined in a Constant Volume Combustion Bomb*. SAE Techn. Pap. Ser. 870586, 1987.
65. KNOTHE, G. *Fuel processing Technology*: 88, 669-677 (2007).
66. BUCK, DF. *J. Am. Oil Chem. Soc.*: 72, 1565 (1981).
67. KUBOW, S. *Nutritions Reviews*: 51, 33 (1993).
68. NAWAR, WW. Em *Lipids*; FENNEMA, OR. Ed. Marcel Dekker, New York, p.139, 1985.
69. SILVA, FAM; BORGES, MFM; FERREIRA, MA. *Quím. Nova*: 22, 94 (1999).
70. BOTTERWECK, AA; VERHAGEN, H; GOLDBOHN, RA; KLEINJANS, J. *Food Chem. Toxicol*: 38, 599 (2000).
71. CRUCES-BLANCO, C; CARRETERO, AS; BOYLE, EM; GUTIÉRREZ, AF. *Talanta*: 50, 1099 (1999).
72. BLASSENGER, J; PRANKL, H; SCHAUFLE, H; MITTELBACH, M; SCHÖBER, S; ZEINER, W. *Stability of Biodiesel – Used as a Fuel for Diesel Engines and Heating Systems. Presentation of the BIOSLAB Project Results*. Graz, Áustria, 2003.

73. TANG, H; SALLEY, SO; SIMON NG, KY. *Fuel*: 87, 3006-3017, 2008.
74. TANG, H; DE GUZMAN, RC; SALLEY, SO; SIMON NG, KY. *J. Am. Oil Chem. Soc.*: 85, 1173-1182 (2008).
75. HOED, VV; ZYAYKINA, N; DE GREYT, W; MAES, J; VERHÉ, R; DEMEESTERE, K. *J. Am. Oil Chem. Soc.*: 85, 701-709 (2008).
76. FERRARI, RA; SOUZA, WL. *Quim. Nova*: 32, 106-111 (2009).
77. CAVALCANTI, E; TOMACHUK, CR; ARAÚJO, FVL; FERRAZ, O; MARQUES, LGC. *Controle da Estabilidade Oxidativa de biodiesel de soja através de mistura de aditivos antioxidantes*. II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel; Brasília, DF, 2007.
78. DINKOV, R; HRISTOV, G; STRATIEV, D; ALDAYRI, VB. *Fuel*: 88, 732-737 (2009).
79. MITTELBACH, M; GANGL, S. *J. Am. Oil Chem. Soc.*: 78, 573-577 (2001).
80. BORSATO, D; MAIA, ECR; MOREIRA, I; SPACINO, KR; RODRIGUES, PRP; GALLINA, AL. *Fuel Processing Technology*: 92, 1750-1755, 2011.
81. HESS, MA; HAAS, MJ; FOGLIA, TA; MARMER, WN. *Energy & Fuels*: 19, 1749-1754, 2005.
82. CAMPOS, GCM; TOLEDO, MCF; *Brazilian Journal of food Technology*: 3, 65-71, 2000.
83. ISO 9936:1997 (2001). *Animal and vegetable fats and oils – Determination of tocopherols and tocotrienols contents – Method using high performance liquid chromatography*.
84. TAGLIABUE, S; GASPAROLI, L; DELLA BELLA, L; BONDIOLI, P. *La Riv. Ital. Delle Sost. Grasse*: 81, 37-40, 2004.
85. ARAÚJO, TA; BARBOSA, AMJ; VIANA, LH; FERREIRA, VS. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*: 79, 409-414, 2010.
86. TORMIN, TF; GIMENES, DT; SILVA, LG; RUGGIERO, R; RITCHER, EM; FERREIRA, VS; MUÑOZ, RAA. *Talanta*: 85, 1274-1278, 2011.
87. ARAÚJO, TA; BARBOSA, AMJ; VIANA, LH; FERREIRA, VS. *Fuel*: 90, 707-712, 2011.
88. TORMIN, TF; CUNHA, RR; RICHTER, EM; MUNOZ, RAA. *Talanta*: 99, 527-531, 2012.

89. CARAMIT, RP; ANDRADE, AGF; SOUZA, JBG; ARAÚJO, TA; VIANA, LH; TRINDADE, MAG; FERREIRA, VS. *Fuel*: 105, 306-313, 2013.
90. CHOONG, YM; LIN, HJ. *Journal of Food and Drug Analysis*: 9, 20-26, 2001.
91. McNAIR, HM; MILLER, JM. *Basic Gas Chromatography*. Second Edition. John Wiley & Sons, New Jersey, 2009.
92. YANG, FJ. *J. Chromatogr. Sci.*: 19, 523-529, 1981.
93. SKOOG, DA; HOLLER, FJ; NIEMAN, TA. *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª edição, Ed. Bookman, Porto Alegre, 2002.
94. BS EN 14103:2011. *Fat and Oil Derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of total esters and linolenic ester contents*. European Standard.
95. BS EN 14110:2003. *Fat and Oil Derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of methanol content*. European Standard.
96. ABNT NBR 15764-2011. *Biodiesel – determinação do teor total de ésteres por cromatografia gasosa*.
97. ABNT NBR 15343-2012. *Biodiesel – determinação do teor de metanol e etanol por cromatografia gasosa*.
98. BS EN 14105:2011. *Fat and Oil Derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents*. European Standard.
99. ASTM D6584-10a^{ε1}. *Standard Test Method for Determination of Total Monoglycerides, Total Diglycerides, Total Triglycerides, and Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography*.
100. ABNT NBR 15908-2012. *Biodiesel – determinação do teor da glicerina livre, monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos e glicerina total por cromatografia gasosa*.
101. BS EN 15779:2009. *Fat and Oil Derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of polyunsaturated (=4 double bonds) fatty acid methyl esters (PUFA) by Gas Chromatography*. European Standard.
102. DOQ-CGCRE-008. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Protocolo do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro), Xerém, RJ, 2010.

103. *Vocabulário Internacional de Metrologia, VIM. Conceitos fundamentais e gerais e termos associados*. 1ª edição Luso-Brasileira. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro), Rio de Janeiro, RJ, 2012.
104. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. Current Step 4 version. ICH Harmonized Tripartite Guideline, 2005.
105. *Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis*. International union of pure and applied Chemistry (IUPAC), 2002.
106. ALBERTAZZI, G; SOUSA, AR. *Fundamentos de metrologia científica a industrial*. Editora Manole, Barueri, SP, 2008.
107. *Eurachem / CITAC Guide – Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Third Edition. CITAC, LGC, UK, 2012.
108. *The Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (ISO GUM)*, 3ª edição brasileira. Inmetro, Rio de Janeiro, RJ, 2003.
109. *Guia Eurachem/Relacre 2. Exemplos de Cálculos de Incertezas*. Relacre, Lisboa, Portugal, 2012.
110. ASTM D1193-06(2011). *Standard Specification for Reagent Water*.
111. ENDE, M; LUFTMANN, H. *Tetrahedron*: 40, 5167-5170, 1984.
112. COUTTS, RT; HARGESHEIMER, EE; PASUTTO, FM. *Journal of Chromatography A*: 179, 291-299, 1979.
113. ZHANG, ZL; HIBBERD, A; ZHOU, JL. *Analytica Chimica Acta*: 577, 52-61, 2006.
114. KINKEL, JN; UNGER, KK. *Journal of Chromatography A*: 316, 193-200, 1984.
115. MOREIRA, DS. *Desenvolvimento de Metodologia Analítica por Cromatografia / Espectrometria de Massas para Avaliação da Ocorrência de Perturbadores Endócrinos em Mananciais de Abastecimento da Região Metropolitana de Belo Horizonte*, p.39. Dissertação de Mestrado, Ouro Preto, MG, 2008.
116. FERREIRA, C. *Caracterização por GC-MS de Glicídios com derivatização assistida por Microondas*. P. 22. Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra, Portugal, 2011.
117. ASTM D6304-07. *Standard Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils, and Additives by Coulometric Karl Fischer Titration*.

118. LANÇAS, FM. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. Ed. Rima, São Carlos, SP, 2004.
119. MEIER, PC; ZUND, RE. *Statistical Methods in Analytical Chemistry*, Second Edition, John Wiley & Sons, New York, NY, pp. 115-118, 2000.
120. Resolução ANP 07, D.O.U. 19.03.2008.
121. SOUZA, SVC; JUNQUEIRA, RG. *Anal. Chim. Acta* 552, 25-35, 2005.
122. MAGALHÃES, WF; MOREIRA, DF. *Analytica* 6, 42-50, 2008.
123. ASTM D664-11a. *Standard Test Method for Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration*.
124. MILLER, JN; MILLER, JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Fourth Edition, Prentice Hall, Harlow, England, 2000.

ANEXO 1 – TRABALHOS PUBLICADOS

1.1 – OLIVEIRA FILHO, W.P. “Avaliação da Estimativa de Incerteza Analítica para o ensaio de Estabilidade à Oxidação a 110 °C em Biodiesel”, Anais do 3º Seminário de Laboratório do Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás (IBP) – Rio de Janeiro-RJ (2010).

Meio de apresentação: oral

O ensaio de Estabilidade à Oxidação a 110 °C em Biodiesel é uma das análises mais críticas para se avaliar a qualidade do biodiesel. A análise avalia a tendência que o biodiesel apresenta em oxidar-se, gerando ácidos graxos livres e outros compostos, que podem danificar componentes de motores de ignição por compressão. A medição é realizada induzindo a amostra de biodiesel a uma oxidação acelerada, mantendo a amostra a uma temperatura de 110 °C e submetendo-a a um fluxo de ar de 10 (dez) litros por hora (1). Ao oxidar-se, a amostra começa a liberar compostos voláteis a tal temperatura, os quais são introduzidos em uma célula com água ultra pura, a qual possui sua condutividade monitorada constantemente. Quando os referidos compostos resultantes da oxidação da amostra começam a se aglomerar no meio aquoso, a condutividade do meio tem um aumento considerável, e o tempo em que este fenômeno acontece indica o resultado do ensaio. A Especificação do Biodiesel em vigor (2) estabelece um mínimo de 6 (seis) horas para que o biodiesel seja aprovado neste ensaio. Este limite segue o estabelecido pela especificação europeia do biodiesel (3).

As exigências atuais de cumprimento a requisitos de qualidade previstos na norma NBR ISO IEC 17025 levam os laboratórios em processo de acreditação, a buscar estabelecer, entre outros parâmetros, o levantamento da incerteza analítica dos ensaios de seus escopos. Para este ensaio, particularmente é um desafio levantar a incerteza analítica, visto que embora o processo físico seja complexo, a medição é direta, isto é, não é necessária a construção de uma curva analítica, tampouco diluições de padrões ou soluções.

Neste estudo, tentou-se seguir a metodologia tradicional de levantamento de incerteza, que consiste em: 1) Levantamento de fontes de incerteza – Tabela 1; 2) Estabelecimento da Equação do Mensurando e traçado do Diagrama de Ishikawa – Figura 1; 3) Medição e quantificação das fontes de incerteza e 4) Elaboração da planilha de incerteza – Tabela 2 (4).

Como pode ser observado na Tabela 1, não foi levada em consideração influência da massa de amostra no levantamento de incerteza, visto que trabalhando dentro de uma faixa de $(3,00 \pm 0,01)$ g não é observada mudança no resultado. Foram consideradas possíveis influências de condutividade, fluxo de ar aplicado e temperatura da amostra

durante o ensaio, além das tradicionais componentes de repetitividade e de resolução do resultado fornecido pelo software do equipamento.

Para o estabelecimento da equação do mensurando, não havia referências que pudessem ser tomadas de base. Logo, verificou-se que o software do equipamento (Metrohm Rancimat 743) fornece o resultado após traçar a segunda derivada da curva de medição experimental Condutividade (C) x Tempo (x), e calcular seu ponto de máximo. Sendo assim, atribuiu-se à curva experimental uma equação de um polinômio de quarto grau (usando ajuste do tipo MMQO):

$$C = ax^4 + bx^3 + cx^2 + dx + e$$

Neste caso, facilmente obtém-se a condição para o ponto de máximo da segunda derivada deste polinômio, através de simples derivação:

$$x = -\frac{b}{4a}$$

Desta forma, chega-se à equação do mensurando (R):

$$R = -\frac{b}{4a} + F + T + S$$

Onde F é a contribuição do fluxo de ar, T é a contribuição da temperatura e S , a contribuição da condutividade medida. Os valores de F , T e S são numericamente nulos, pois suas contribuições não corrigem o resultado, apenas incluem fontes de incerteza. Como não se dispõe de algoritmo estabelecido para o cálculo das incertezas relativas aos coeficientes a e b , (ao contrário de uma regressão linear, por exemplo) optou-se por considerar estas incertezas nulas, e inserir a componente de reprodutibilidade, obtida por um ensaio com diferentes analistas.

Fonte de incerteza	Descrição
μ_{cond}	Incerteza da condutividade medida.
μ_{fluxo}	Incerteza do fluxo de ar aplicado.
μ_{temp}	Incerteza da temperatura estabelecida durante o ensaio.
μ_{res}	Incerteza da resolução do resultado
μ_{repe}	Incerteza na repetitividade
μ_{repro}	Incerteza na reprodutibilidade.

Figura 1. Diagrama de Ishikawa para o ensaio.

Os respectivos coeficientes de sensibilidade foram obtidos experimentalmente, com exceção daqueles relativos à repetitividade, reprodutibilidade e resolução, em que nestes casos foi atribuído o valor 1,00, por já estarem na mesma unidade do resultado (horas). Considerou-se $\mu_{\text{temp}} = 0$, visto que o sensor de temperatura compatível do

fabricante do equipamento não se encontrava calibrado, impedindo medições rastreáveis de possíveis variações de temperatura. Ao final, obteve-se uma incerteza expandida (U) de 0,33 horas.

Símbolo	Valor	Unidade	Distribuição	Divisor	Valor do c.sens.	Unidade do c.sens.	Incerteza padrão	Graus de liberdade
μ_{cond}	0,50	μScm^{-1}	Retangular	1,73	0,20	$\text{hcm}\mu\text{S}^{-1}$	0,06	Infinito
μ_{iluxo}	0,90	Lh^{-1}	Retangular	1,73	0,20	h^2L^{-1}	0,10	Infinito
μ_{temp}	0,00	$^{\circ}\text{C}$	Retangular	1,73	1,00	$\text{h } ^{\circ}\text{C}^{-1}$	0,00	Infinito
μ_{res}	0,01	h	Retangular	1,73	1,00	h	0,01	Infinito
μ_{repe}	0,21	h	Normal	2,00	1,00	h	0,11	6
μ_{repro}	0,04	h	Normal	2,00	1,00	h	0,02	2

Incerteza combinada	Distribuição	Graus de liberdade efetivos	Fator de abrangência	Incerteza expandida (U)	Unidade
0,16	Normal	32	2,08	0,333	h

Tabela 2. Planilha para estimativa da incerteza do ensaio.

Observando os dados experimentais, conclui-se que a equação do mensurando deve ser reescrita, a fim de satisfazer os coeficientes de sensibilidade encontrados:

$$R = -\frac{b}{4a} + \frac{F}{5} + \frac{S}{5} + T$$

Referências

- 1 – EN14112:2003 – FAME – Determination of oxidation stability.
- 2 – Resolução ANP 07/08, DOU 20/03/2008.
- 3 – EN14214:2003 – FAME – Requirements and Test Methods.
- 4 – Guia EURACHEM/CITAC, 2ªEd. Versão Brasileira QUAM:2002.

Agradecimentos

ANP, Fundação CERTI e Brasil Ecodiesel S/A.

- 1.2 – OLIVEIRA FILHO, W.P., REZENDE, M.O.O.** “Desenvolvimento de metodologia de determinação de antioxidantes sintéticos em biodiesel por Cromatografia Gasosa”, Anais do 16º Encontro Nacional de Química Analítica, USP – Campos do Jordão-SP (2011).

Meio de apresentação: pôster

**Desenvolvimento de metodologia de determinação de
antioxidantes sintéticos em biodiesel por Cromatografia
Gasosa**

Waldemar P. de O. Filho^{a,b*} (PG), Maria Olímpia de O. Rezende^a (PQ)

^aInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

^bCentro de Pesquisas e Análises Tecnológicas, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Brasília, DF, Brasil

*e-mail: wfilho@anp.gov.br

Nos últimos anos, tem-se dado importância peculiar para a questão da estabilidade à oxidação do biodiesel, visto que uma considerável instabilidade do produto pode levar à formação de compostos que podem causar danos a componentes do motor, assim como levar à formação de particulados antes e depois da mistura do produto com óleo diesel mineral¹. Sabe-se que os antioxidantes sintéticos são necessários para biodiesel oriundo de matéria-prima com certo grau de insaturação, como por exemplo soja, canola e girassol, no sentido de que o produto atenda as especificações em vigor. Alguns estudos constantes na literatura tem obtido a performance dos antioxidantes sintéticos em biodiesel^{2,3}. Neste cenário, é importante a disponibilidade de metodologia que determine a concentração dos antioxidantes já adicionados ao biodiesel, para possibilitar a melhoria dos estudos de performance e também de estabilidade do próprio biodiesel. Existe metodologia que utiliza cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (HPLC-UV)⁴ e outra por voltametria², aplicáveis para alguns antioxidantes. Aqui, é apresentada metodologia por cromatografia gasosa com detecção de ionização por chama (GC-FID), que a princípio possui a vantagem de utilizar a mesma instrumentação já aplicada para certificação de biodiesel em análises de rotina, como teor de éster, glicerina livre, glicerina total, monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos. O método tem se mostrado robusto, com boa recuperação e de fácil aplicação. Até o presente momento, tem sido usado para determinação dos antioxidantes tert-butil-hidroquinona (TBHQ) e butil-hidroxitolueno (BHT), compostos usados com frequência na produção do biodiesel de soja nacional. A Figura 1 mostra cromatogramas de curva analítica levantados durante o desenvolvimento da metodologia, e a Figura 2 ilustra um cromatograma de amostra de biodiesel com destaque para o pico observado para o TBHQ.

Figura 1. Cromatogramas de curva analítica para TBHQ obtidos pelo método.

Figura 2. Amostra de biodiesel de soja acusando TBHQ.

¹Knothe, G, Gerpen, JV, Krahl. The Biodiesel Handbook. AOCS Press, 2005.

²Araujo, TA, Barbosa, AMJ, Viana, LH, Ferreira, VS. Fuel, 90, 2011, 707.

³Dunn, RO. Fuel Process Technology, 86, 2005, 1071.

⁴Tagliabue S, Gasparoli A, Bella, DL, Biodioli, P. Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse, 81, 2004, 37.

- 1.3** – OLIVEIRA FILHO, W.P., REZENDE, M.O.O. “Estimativa de incerteza na determinação de antioxidantes sintéticos em biodiesel”, Anais do 14º. Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO), Centro de convenções – Florianópolis-SC (2012).

Meio de apresentação: oral

A partir de método proposto para determinação de antioxidantes sintéticos em biodiesel por cromatografia gasosa (método que utiliza coluna de alta temperatura, injetor *on-column*, e agente silanizante, devido aos grupos hidroxilas fenólicos do analitos) estimou-se a incerteza de medição utilizando como base protocolos sugeridos no guia ISO GUM, Guia Eurachem : Citac e Eurachem : Relacre. Para isso, foram consideradas fontes de incerteza de regressão linear, fontes de incerteza relacionadas às medições de massas, fontes de incerteza quanto aos padrões de calibração e fonte de incerteza relativa à repetibilidade. As fontes de incerteza relacionadas aos padrões de calibração geraram outras sub-fontes de incerteza, como fonte de incerteza de massas e volumes medidos no preparo desses padrões, e cada uma dessas fontes foi devidamente quantificada. Em seguida, obteve-se relação entre a incerteza final e a faixa de aplicação do método, onde verificou-se uma variação entre 7 % e 20 % dessa incerteza final em relação à concentração de analito. Concluiu-se que a incerteza de medição do método atende a requisitos de aceitação internacionais, e que é compatível com as necessidades de determinação desse tipo de analito a fim de atender os usuários, particularmente produtores de biodiesel, que têm comumente utilizado antioxidantes sintéticos em seus processos de obtenção.

ANEXO 2 – EQUAÇÕES COMPLEMENTARES UTILIZADAS NAS REGRESSÕES LINEARES

2.1 – Equações complementares utilizadas nas regressões pelo MMQO.

$$a = \frac{m \times \sum x_i y_i - \sum x_i \times \sum y_i}{S_{xx}}$$

$$b = \frac{\sum x_i^2 \times \sum y_i - \sum x_i \times \sum x_i y_i}{S_{xx}}$$

Onde:

a é o coeficiente angular;

b é o coeficiente linear;

x_i é o valor da grandeza de entrada do eixo x da curva analítica;

y_i é o valor da resposta instrumental.

m é o número de leituras de padrões de calibração.

S_{xx} é dado pela equação 8.

$$cov(a, b) = \frac{s_{res}^2 \times \sum x_i}{S_{xx}}$$

Onde:

$cov(a, b)$ é a co-variância entre os coeficientes angular e linear da regressão;

s_{res} é dado pela equação 5.

2.2 – Equações complementares utilizadas nas regressões pelo MMQP.

$$a = \frac{\sum w_i \times \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \times \sum w_i y_i}{S_{xx}}$$

$$b = \frac{\sum w_i x_i^2 \times \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \times \sum w_i x_i y_i}{S_{xx}}$$

Onde:

w_i é dado pela equação 3;

S_{xx} é dado pela equação 13.

$$cov(a,b) = -\frac{\sum w_i x_i}{S_{xx}}$$

Onde:

$cov(a,b)$ é a co-variância entre os coeficientes angular e linear da regressão.

ANEXO 3 – EQUAÇÕES UTILIZADAS NOS TESTES ESTATÍSTICOS PARA DEFINIÇÃO DO MÉTODO DE REGRESSÃO

3.1 – Equações utilizadas no teste de Jackknife

$$h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}}$$

Onde

h_i é o resíduo padronizado;

n é o número de resíduos;

x_i é a variável de entrada (aqui, massas de antioxidante);

$\bar{x}$ é a média das variáveis de entrada.

S_{xx} é dado pela fórmula abaixo.

$$S_{xx} = \frac{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}{n}$$

$$e_i = y_i - (b + a \times x_i)$$

Onde

e_i é o resíduo;

y_i é a resposta instrumental referente ao resíduo (aqui, área do pico);

b é o coeficiente linear da equação de regressão por MMQO;

a é o coeficiente angular da equação de regressão por MMQO;

$$r_i = \frac{e_i}{\sqrt{M \times (1 - h_i)}}$$

Onde:

r_i é o coeficiente outlier;

M é dado pela equação abaixo:

$$M = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2 - a^2 \times S_{xx}}{n - 2}$$

Onde:

$\bar{y}$ é a média das respostas instrumentais.

$$J_{ei} = r_i \times \left(\sqrt{\frac{n - 3}{n - 2 - r_i^2}} \right)$$

Onde:

J_{ei} é o coeficiente Jackknife calculado.

$$J_{crítico} = t_{0,05;n-3}$$

Onde:

$J_{crítico}$ é o t de student para $n - 3$ graus de liberdade e 95 % de confiança.

3.2 – Equações utilizadas no teste de Ryan-Joiner.

$$p_i = \frac{\left(i - \frac{3}{8}\right)}{\left(n + \frac{1}{4}\right)}$$

Onde:

p_i é o fator ponderante do resíduo para o teste de Ryan-Joiner.

i é o número do resíduo (de 1 a 15, neste trabalho).

$$R = r(e_{icresc}; q_i)$$

Onde:

R é o coeficiente de Ryan-Joiner.

r é o coeficiente de correlação entre o conjunto de e_{icresc} e o conjunto de q_i .

e_{icresc} é o conjunto de resíduos ordenados em ordem crescente de valores.

q_i é o inverso da função normal em relação a p_i .

3.3 – Equações utilizadas no teste de Durbin-Watson.

$$d = \frac{\sum (e_i - e_{i-1})^2}{\sum e_i^2}$$

Onde:

d é o coeficiente de Durbin-Watson.

e_{i-1} é o resíduo adjacente.

$$d_L = 1,9693 + \left(-\frac{2,8607}{\sqrt{n}}\right) + \left(-\frac{3,4148}{n}\right) + \left(\frac{16,64}{n^2}\right)$$

Onde:

d_L é o coeficiente crítico superior para correlação.

$$d_U = 1,9832 + \left(-\frac{3,0547}{\sqrt{n}}\right) + \left(\frac{1,3862}{n}\right) + \left(\frac{16,3662}{n^2}\right)$$

Onde:

d_U é o coeficiente crítico inferior para independência.

3.4 – Equações utilizadas no teste de Brown-Forsythe.

$$d_k = |e_{kj} - e_k|$$

Onde:

d_k é o desvio individual do resíduo do grupo k , em relação à mediana do grupo.

e_{kj} é o resíduo individual do grupo k .

e_k é a mediana do grupo k .

$$SQD_k = \sum (d_k - \bar{d}_k)^2$$

Onde:

SQD_k é a soma dos desvios quadráticos dos desvios individuais em relação à mediana do grupo k .

$\bar{d}_k$ é a média dos desvios individuais em relação à mediana do grupo k .

$$s_p^2 = \frac{\sum SQD_k}{\sum n_k - 2}$$

Onde:

s_p^2 é a variância dos desvios individuais segundo à mediana inter grupos.

n_k é o número de resíduos do grupo k.

$$t_L = \frac{\overline{d_1} - \overline{d_2}}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \times s_p^2}}$$

Onde:

t_L é o coeficiente de Brown-Forsythe calculado para os grupos.

$\overline{d_1}, \overline{d_2}, n_1, n_2$ são correspondentes a $\overline{d_k}$ e n_k .

$$p = \text{valordistribuição } t(|t_L|; n_1 + n_2 - 2)$$

Onde:

P é o valor p que corresponde à área integrada da função t de student com $t = t_L$ e $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade, considerando a função bicaudal.

ANEXO 4 – PARÂMETROS DE QUALIDADE PARA ALGUMAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE BIODIESEL UTILIZADAS NESTE TRABALHO

Parâmetro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aspecto (23 °C)	LII	LII	LII	LII	LII	LII	LII	LII	LII	LII
Massa Específica a 20 °C, kg/m ³	881	884	889	879	879	881	879	882	880	880
Viscosidade Cinemática a 40 °C, mm ² /s	4,2	4,4	4,4	4,3	4,3	4,6	4,4	4,2	4,6	4,8
Ponto de Fulgor, °C	125	138	169	129	155	131	133	174	170	166
Água, mg/kg	452	441	395	369	424	481	459	487	422	456
Contaminação Total, mg/kg	8	11	9	9	9	18	8	22	15	21
Cinzas Sulfatadas, %massa	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Enxofre, mg/kg	2,5	3,8	2,7	8,9	7,2	7,5	8,5	8,3	5,2	6,3
Corrosividade ao Cobre (3h a 50 °C)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ponto de Entupimento de filtro a frio, °C	-2	-4	-1	-5	-4	0	5	-1	6	4
Número de Cetano*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resíduo de Carbono, % massa	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02
Índice de Acidez, mgKOH/g	0,42	0,34	0,36	0,33	0,29	0,46	0,25	0,29	0,37	0,35
Índice de Iodo, g/100g	115	118	125	123	130	110	115	104	109	102
Metanol ou Etanol, %massa**	0,14	-	-	0,07	-	-	-	-	-	-
Glicerol livre, %massa	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02
Glicerol Total, %massa	0,22	0,18	0,22	0,24	0,15	0,22	0,20	0,19	0,21	0,20
Monoacilglicerol, %massa	0,62	0,50	0,66	0,75	0,34	0,62	0,59	0,48	0,57	0,53
Diacilglicerol, %massa	0,18	0,12	0,14	0,16	0,18	0,18	0,16	0,19	0,18	0,18
Triacilglicerol, %massa	0,09	0,11	0,14	0,08	0,11	0,09	0,09	0,14	0,12	0,12
Sódio + Potássio, mg/kg	2,8	3,1	1,5	1,8	1,8	1,6	1,7	2,1	2,0	1,6
Cálcio + Magnésio, mg/kg	ND	ND	0,9	ND	0,4	0,7	2,0	1,1	ND	ND
Fósforo, mg/kg	0,5	1,5	1,2	1,9	2,5	1,0	ND	1,5	ND	ND
Estabilidade à Oxidação a 110 °C, h	7,5	6,6	6,9	8,8	7,1	9,5	9,9	7,2	10,4	10,2
Teor de éster, % massa	97,6	96,9	97,4	98,1	98,2	97,0	96,7	98,0	97,7	97,4

(*) O Número de Cetano é um ensaio exigido ao produtor apenas trimestralmente, não necessitando constar em todos os certificados de qualidade¹⁴.

(**) O ensaio de Metanol ou Etanol não é exigido caso o Ponto de Fulgor esteja acima de 130 °C¹⁴.