



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**NOROSKA GABRIELA SALAZAR MOGOLLÓN**

**CARACTERIZAÇÃO DE BIODIESEL E MISTURAS BXX POR  
GC×GC-FID E GC×GC qMS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA  
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM  
QUÍMICA NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.**

**ORIENTADOR: PROF. DR. FABIO AUGUSTO  
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RONEI JESUS POPPI**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA  
POR NOROSKA GABRIELA SALAZAR MOGOLLÓN, E ORIENTADA PELO PROF.DR. FABIO AUGUSTO**

---

**Assinatura do Orientador**

CAMPINAS, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS-  
CRB8/8144- BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA  
UNICAMP**

M725c Mogollón, Noroska Gabriela Salazar(1986-).  
Caracterização de biodiesel e misturas BXX por  
GC×GC-FID e GC×GC qMS/ Noroska Gabriela Salazar  
Mogollón.–Campinas,SP: [s.n.], 2012.

Orientador:Fabio Augusto.  
Coorientador:Ronei Jesus Poppi

Dissertação(mestrado)-Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Química.

1.Biodiesel.2.MPCA.3.Misturas BXX.4.GC×GC.  
5.MCR-ALS.I. Augusto,Fabio.II. Poppi, Ronei Jesus.  
III. Universidade Estadual de Campinas.Instituto de  
Química.IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:**

Characterization of biodiesel and mixtures BXX by GC×GC-FID and GC×GC-qMS

**Palavras-chave em inglês:**

Biodiesel  
MPCA  
Mixtures BXX  
GC×GC  
MCR-ALS

**Área de concentração:**Química Analítica

**Titulação:** Mestra em Química na área de Química Analítica

**Banca examinadora:**

Fabio Augusto [Orientador]  
Carol Hollingworth Collins  
Stanislau Bogusz Junior

**Data de defesa:**16/07/2012

**Programa de pós-graduação:**Química



*“La vida es cuestión de actitud, escucha y aprende de cada ángel que Dios coloca en tu camino, llénate de bellas experiencias, realiza siempre la buena acción del día, el triunfo está en tus manos, existen solo dos días durante los cuales no puedes lograr cosa alguna: ayer y mañana, el resto o sea hoy nos da todas las herramientas necesarias para conseguir lo que deseas, vive intensamente y jamás olvides el mágico poder que Dios colocó dentro de ti, el éxito depende de nosotros y recuerda el que no oye NO TRIUNFA !!”*

*Norka Mogollón de Salazar*





Dedico este trabajo a mi Madre Norka Mogollón de Salazar, tu mi ángel guardián mi más hermoso ejemplo de vida, a ti mi lucha y esfuerzo, con tu gran actitud me enseñaste a vivir llenando cada espacio de mi de bellas lecciones de vida, tu recuerdo está presente segundo a segundo de mi existencia, seguiré orgullosamente tu ejemplo para siempre mamá TE AMO A TIEMPO.

Mi Padre Oscar Salazar por ser ese apoyo incondicional que nunca me ha de faltar, ese hombre ejemplar que conmigo está en cada paso que emprendemos, gracias por ser mi mejor cómplice en cada nuevo camino, por llevarme de la mano, por tanto amor que me mantiene fuerte ante las pruebas que la vida nos coloca para hacernos mejores seres espirituales, TE AMO eternamente mi viejo.

Mi Tía Nadeska Mogollón, tu mi segunda mamá a ti por ser ese refugio de paz , cariño y amor, solo tu mi tía bella eres capaz de aconsejarme como una madre y de vivir intensas emociones conmigo como una hermana, gracias por ser el apoyo en cada nueva tarea que emprendemos juntas este logró también es para ti TE AMO mi reina!.

Ustedes tres son mi tesoro más preciado, ustedes mi fuerza mi entereza mi enseñanza mis valores mi crianza a ustedes lo que soy los amo inmediblemente familia.

*Noroska Gabriela Salazar Mogollón.*



## Agradecimientos

A Dios, por darme la oportunidad de un mayor crecimiento espiritual día tras día, gracias por la vida mi Señor, gracias por los ángeles que colocas en mi camino para ayudarme a evolucionar.

A mi equipo espiritual, mis espíritus maestros mi ángel de la guarda, sin su ayuda, su bendición y sus buenas energías nada de esto hubiese sido posible, gracias.

A mi novio José Luis Escalona, llegaste en el momento indicado a mi vida para llenarme de amor y de fortaleza eres mi apoyo incondicional, mi mitad, el complemento que en mi vida faltaba, un logro de los muchos que nos quedan por vivir de la mano mi amor, que Dios te bendiga y nos mantenga unidos por el resto de nuestras existencias te amo mi cielo mil gracias.

Mi primo hermano Samuel Maita Mogollón, porque en los momentos más difíciles tu apoyo jamás faltó, sentirme protegida a tu lado es una bendición. Gracias por ser, por estar, por formar parte de mi vida. Te amo inmediblemente hermano, gracias.

A mi perrita hermosa Sarahy Valentina (Ipacaraiiii) gracias por la calma de la que me llenas y las risas que me arrojas siempre que estamos juntas ¿Quién es la perrita más linda del universo, quien es, quién es??!!

Mis amigos y hermanos inseparables Virginia Valbuena, Gloria Escalona, Jeniree Rampersad, Joel Medina, Omar Ortiz, Denisse Guevara, Pedro Pablo Florez, Aracelis Pamphile, Mauro Martinez, Maraid Sosa, mi bella madre Delia Elizabeth Valbuena, mi padrecito Luis Ramón ni en la distancia los sentí lejos, gracias por el apoyo, el amor y el ánimo que me daban día tras día, los extraño muchísimo pero siempre los sentí cerquita de mí, mil gracias por formar parte de esta meta cumplida.

Mi hermano Leandro, meus amigos Soraia Braga, Filipe Braga, minha querida Lucilia (Lú) , Karina Fukuda, Mariana Gama, Stanis (El catire), Pablito, Bruna Toledo, Helga

Aleme, Christian Araque (mi primer apoyo dentro de Brasil). Muito obrigada por fazer melhor meu ambiente de trabalho, por me fazer sentir parte de vocês por compartilhar comigo sua cultura, graças a vocês Brasil é para mim, meu segundo lar.

Mi hermanita Mónica Mamián la colombianita más especial que jamás haya conocido y mi compañera de casa Rosario Aparicio mil gracias por hacerme amena la estadía fuera de casa, con ustedes comprendí que cualquier parte del mundo se puede convertir en un hogar, mil gracias por ser la familia que Dios me dejo escoger.

Aos Professores Fabio Augusto e Ronei Poppi pelo apoio fundamental na realização deste trabalho, pela compreensão e confiança dada.

Ao INSTITUTO DE QUIMICA DA UNICAMP.

Muito Obrigada a todos.

## ***Curriculum vitae***

### Formação Acadêmica/Titulação

2009 – Atual Mestrado em Química.

Universidade Estadual de Campinas. Título: Caracterização de biodiesel e misturas BXX por GC×GC-FID e GC×GC-qMS

Orientador: Fabio Augusto

Co-orientador: Ronei Jesus Poppi

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

2005 – 2009 Graduação em Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológica.

Universidad Central de Venezuela.

### Experiência Laboral:

Empresas polar, investigador 04-2009

Ponce&Benzo, 01-2010 Analista fisicoquimico

### Apresentação de Trabalhos:

Apresentação oral no III Workshop de Quimiometria, Abril 2011. “Agrupamento de amostras de biodiesel de acordo com a matéria prima usando cromatografia gasosa bidimensional abrangente e MPCA” Helga Aleme, Noroska G S Mogollón, Ronei Poppi e Fabio Augusto

Apresentação de Poster / Painel no(a) 16 Encontro Nacional de Química Analítica, 2011. (Congresso) Deteminação de perfis cromatográficos em cromatografia bidimensional abrangente de biodieseis de soja preparados por ultrasonização. Noroska G. S. Mogollón, Leandro Wang Hantao, Stanislau Bogouz Junior, Ronei Poppi e Fabio Augusto

Trabalho realizado para a obtenção do título de bacharel em química:

“Estudio de la generación de color caramelo en sistemas glucosa-fructosa y amoníaco” Noroska G. S. Mogollón , Julio Herrera e Andrés Escalona, trabalho de graduação. Abril 2009.

Participação em eventos

I Workshop em avanços recentes no preparo de amostras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto março 2012.

Workshop de Técnicas Analíticas e Quimiométricas Aplicadas ao Desenvolvimento de Novos Produtos Farmacêuticos/Pré-Formulação, realizado no dia 10 de novembro de 2011

Submissão de artigos:

"Sorbents for Solid Phase Extraction: New Materials and Trends" for consideration for publication in Trends in Analytical Chemistry. Fabio Augusto, Leandro Wang Hantao, Noroska S Mogollon, Soraia Braga.

## RESUMO

### **Caracterização de biodiesel e misturas BXX por GC×GC-FID e GC×GC-qMS**

Neste trabalho, foram aplicadas metodologias quimiométricas para a caracterização de biodieseis de diversas origens, junto à sua quantificação em misturas BXX (biodiesel em diesel mineral), por meio de dados fornecidos por GC×GC-FID, com uma alta capacidade de separação e detectabilidade, em conjunto com algoritmos de classificação e de resolução de curvas para quantificação de misturas complexas. Primeiramente, foram otimizadas as condições de trabalho aplicadas no preparo de biodiesel, escolhendo-se em seguida o melhor conjunto de colunas que separou os ésteres metílicos provenientes do biodiesel. Foram analisadas amostras de biodieseis de soja com tempos de envelhecimento diferentes nos distintos conjuntos de colunas. Com os dados fornecidos, foi aplicado o algoritmo de classificação análise de componente principal multimodo (MPCA), observando-se a separação entre os biodieseis de óleo de soja novo e envelhecido e, com tais dados, escolheu-se o conjunto que melhor executou a classificação. Em seguida, foram analisadas amostras de biodieseis de diferentes matérias primas, realizando-se a classificação dos mesmos pelo MPCA, observando-se os compostos responsáveis pela diferença entre os mesmos, também identificados por GC×GC-qMS. Finalmente, para a quantificação, foi construída uma curva de calibração analítica com misturas BXX de biodiesel de óleo de soja novo, e para a validação da curva, utilizaram-se biodieseis de diferentes matérias primas, desprezando-se os compostos que diferiram nas diferentes amostras, resultando em um algoritmo útil para quantificar misturas BXX com biodieseis de qualquer fonte.





## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF BIODIESEL AND MISTURES BXX BY GC×GC-FID E GC×GC-qMS

Chemometric methods were applied for characterization of biodiesel from different origins, along with their quantification in mixtures BXX (biodiesel in mineral diesel) through data collected from GC×GC-FID. This takes advantage of the high separation capacity and the detectability of the two-dimensional system along with classification algorithms and curve resolution for complex mixture quantification. And the first step, the working conditions for preparing biodiesel were optimized, taking the best set of columns that separated the methyl esters from the biodiesel. Samples of soybean oil biodiesel were analyzed with different aging times in different sets of columns. With the data obtained, the MPCA classification algorithm was applied. Observing the separation between the biodiesels, the data was used for picking the best set of columns for the execution of the classification. Next, biodiesel samples from different raw materials were analysis, performing their classifications by MPCA, observing the compounds responsible for the difference between the biodiesels. These were also identified by GC×GC-qMS. Finally for quantification, a calibration curve with BXX mixtures of new soybean oil biodiesel was constructed for validation. Using biodiesel made out of different raw materials from various sources, ignoring compounds that differ in the biodiesel, a useful algorithm to quantify biodiesel blends BXX with any raw material was obtained.



## SUMARIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	xix
LISTA DE TABELAS .....	xxi
LISTA DE FIGURAS .....	xxiii

### Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>11</b>
<b>3. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>15</b>
3.1 Biodiesel.....	15
3.2 Importância do Biodiesel.....	15
3.2.1 Processo de preparo básico de biodiesel .....	16
3.2.2 Reações de transesterificação para a produção do biodiesel.....	17
3.2.3 Variáveis mais importantes no preparo de biodiesel: .....	17
3.2.4 Misturas biodiesel-diesel .....	21
3.3 Técnicas de análises de biodiesel em diesel mineral: .....	22
3.3.1 Análise de biodiesel e misturas diesel/biodiesel por cromatografia gasosa convencional: .....	23
3.4 Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) .....	25
3.3.2 Colunas, capacidade de picos e ortogonalidade em GC×GC.....	26
3.3.4 Modulador .....	29
3.3.5 Análises de biodiesel e misturas biodiesel/ diesel mineral por GC×GC. ....	32
3.3.6 Quimiometria em GC×GC .....	36
<b>4. Materiais e métodos.....</b>	<b>45</b>
4.1 Materias e reagentes .....	45
4.2 Preparação de biodiesel:.....	45
4.2.1 Preparo convencional (em lote):.....	45
4.2.2 Preparação do biodiesel assistida por ultrassom .....	46
4.3 Colunas Cromatográficas e Programação de Temperatura. ....	47
4.4 Parâmetros operacionais no GC×GC-FID .....	47
4.5 Parâmetros operacionais no GC×GC-qMS.....	48
4.5.1 Identificação dos analitos.....	48
4.6 Aquisição e interpretação de dados .....	49

4.7	Análise multivariada .....	49
4.7.1	Análise exploratória (MPCA) .....	49
4.8	Variação das condições de preparo de biodiesel de soja .....	50
4.9	Avaliação da combinação de diferentes conjuntos de colunas de polaridades e espessuras diferentes .....	50
4.10	Avaliações de biodieseis de quatro diferentes tipos de óleo mais sebo bovino como matérias primas .....	51
4.11	Quantificação de misturas BXX por o método de resolução de curvas (MCR-ALS) .....	51
<b>5.</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>55</b>
5.1	Modo de preparo de biodiesel .....	55
5.1.1	Condições de preparo do biodiesel .....	56
5.2	Identificação dos ésteres metílicos minoritários em biodieseis de diversas fontes e matérias primas.....	57
5.3	Avaliação da combinação de diferentes conjuntos de colunas de polaridades e espessuras diferentes .....	62
5.4	Avaliação de biodieseis de diferentes procedências e matérias primas .....	72
5.5	Quantificação de misturas BXX por o método de resolução de curvas MCR-ALS .....	77
<b>6.</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliográficas .....</b>	<b>105</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<sup>1</sup>D: primeira dimensão

1D-GC: cromatografia gasosa monodimensional/convencional (do inglês, “*monodimensional/conventional gas chromatography*”)

<sup>1</sup>t<sub>R</sub>: tempo de retenção na primeira dimensão

<sup>2</sup>D: segunda dimensão

<sup>2</sup>t<sub>R</sub>: tempo de retenção na segunda dimensão

FAME: ésteres metílicos de ácidos graxos (do inglês, “*Fatty acid methyl éster*”)

FID: detector por ionização em chama (do inglês, “*flame ionization detector*”)

GC: cromatografia gasosa (do inglês, “*gas chromatography*”)

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada a espectrometro de massas (do inglês, “*gas chromatography coupled to a mass spectrometer*”)

GC×GC: cromatografia gasosa bidimensional abrangente (do inglês, “*comprehensive two-dimensional gas chromatography*”)

GC×GC-FID: cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detecção por ionização em chama

GC×GC-qMS: cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometro de massas com analisador quadrupolar

GC×GC-TOFMS: cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometro de massas com analisador por tempo de voo

GC-GC: cromatografia gasosa bidimensional de frações parciais (ou por *heartcut*)

HP-5: coluna capilar com fase estacionária de composição 5% fenil-95% dimetilsiloxano

HP-50: coluna capilar com fase estacionária de composição 50% fenil-50% dimetilsiloxano

LTPRI: índice de retenção com programação linear de temperatura (do inglês, “*linear temperature programed retention index*”)

m/z: razão massa / carga

MCR: Método de resolução de curvas (do inglês, “*Multivariate Curve Resolution*”)

MPCA: Analisis de componentes principais multimodo (do inglês “*multiway principal components analysis*”)

MS: espectrometria de massas (do inglês, “*mass spectrometer*”)

qMS: espectrômetro de massas com analisador quadrupolar (do inglês, “*mass spectrometer with quadrupolar analyzer*”)

RMSPD: raiz do erro quadrado do desvio percentual (do inglês, *root Mean Square Predictive Difference*)

RMSEP: erro quadrático médio da previsão (do inglês, *root mean squared error of prediction*)

SPWax: coluna capilar com fase estacionária de polietilenoglicol

SLB-IL61: coluna capilar com fase estacionária de cristal líquido, líquido iônico.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores (% m/m) em ácidos graxos de óleos vegetais para produção de biodiesel .....	5
Tabela 2. Conjuntos de colunas empregados para análises por GC×GC- FID e -qMS..	47
Tabela 3. Condições de reação variadas no modo de preparo de biodiesel .....	50
Tabela 4. Diferentes tratamentos para o preparo de biodiesel de soja.....	56
Tabela 5. Ésteres metílicos de ácidos graxos identificados por GC×GC-qMS em amostras de biodiesel de óleo de soja novo, óleo de soja envelhecido, óleo de soja recuperado, óleo de soja não refinado, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de canola e sebo bovino. ....	61
Tabela 6. Resolução determinada pelo Teorema de Pitágoras para picos adjacentes com relação ao pico correspondente C20:1n-6 (5). ....	71
Tabela 7. Concentrações calculadas e reais de biodiesel de soja em diesel mineral para a validação da curva obtida. valores em % (v / v), erros absolutos e erro relativo em (% , v / v).....	85
Tabela 8. Valores de RMSPD e RMSEP para cada mistura BXX biodiesel de soja em diesel mineral para diversas concentrações de enxofre.....	87
Tabela 9. Concentrações calculadas e reais de biodiesel de milho em diesel mineral para a validação da curva obtida. Valores em % (v / v), erros absolutos e erro relativo em (% , v / v) .....	88
Tabela 10. Valores de RMSD e RMSEP para cada mistura BXX biodiesel de milho em diesel mineral para diversas concentrações de enxofre.....	89
Tabela 11. Concentrações calculadas e reais de biodiesel de girassol em diesel mineral para a validação da curva obtida. Valores em % (v / v), erros absolutos e erro relativo em (% , v / v). ....	90
Tabela 12. Valores de RMSD e RMSE para cada mistura BXX biodiesel de milho em diesel mineral para diversas concentrações de enxofre.....	92
Tabela 13. Concentrações calculadas e reais de biodiesel de canola em diesel mineral para a validação da curva obtida. Valores em % (v / v), erros absolutos e erro relativo em (% , v / v) .....	93



Tabela 14. Valores de RMSD e RMSEP para cada mistura BXX biodiesel de canola em diesel mineral para diversas concentrações de enxofre. ....	95
Tabela 15. Concentrações calculadas e reais de biodiesel misto em diesel mineral para a validação da curva obtida. Valores em % (v / v), erros absolutos e erro relativo em (% , v / v). ....	96
Tabela 16. Valores de RMSD e RMSEP para cada mistura BXX biodiesel misturado em diesel mineral para diversas concentrações de enxofre. ....	98

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma de óleo de peixe adquirido no sistema GC×GC-FID. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C·min <sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma a 240 °C por 25 min; período de modulação: 6 s; vazão 0,6 mL min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição: 100 Hz; introdução da amostra: SPME; temperatura do injetor e detector 250°C; conjunto de colunas: HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) e SPWax (1 m × 0,1 mm × 0,1 μm)[20].	7
Figura 2. Transesterificação de triglicerídeos.	16
Figura 3. Reação de saponificação.	17
Figura 4. Representação gráfica da capacidade de picos em GC×GC	27
Figura 5. Agrupamento e estruturação de compostos quimicamente semelhantes em um cromatogramas bidimensional.	28
Figura 6. Ilustração do processo de modulação básico para um modulador de 4 jatos - 1. Etapa de coleta; 2. Etapa de focagem; 3. Reinício). B – 1. Ilustração de um pico cromatográfico composto por 3 analitos coeluídos; 2. Ilustração do pico cromatográfico modulado; 3. Visualização do cromatograma na forma de diagrama de contorno. Figura baseada em J. Dallüge et al. “Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography: a powerful and versatile analytical tool” J. Chromatogr. A 2003.	30
Figura 7. Geração e visualização dos cromatogramas em GC×GC	31
Figura 8. Ilustração da separação de FAME e hidrocarbonetos em amostras de diesel B5 em um conjunto de colunas polar × não-polar	34
Figura 9. Ilustração da separação de biodiesel de sebo bovino e hidrocarbonetos provenientes do diesel mineral em uma mistura B20 (A) Conjunto polar-apolar, (B) Conjunto apolar-polar.	35
Figura 10. Decomposição da matriz de dados PCA, matriz de escores e pesos	38
Figura 11. Esquema para análises de MCR-ALS de GC×GC-FID.	40
Figura 12. Cromatograma de biodiesel de soja feito com a técnica de preparo convencional em lote adquirido no sistema GC×GC-FID. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min <sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma por 16min; Período de modulação de 6 s; vazão 0,6 mL min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição: 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 °C; conjunto de colunas 1; volume de injeção 1 μL.	55

- Figura 13. Cromatograma de biodiesel de soja assistido com ultrassom adquirido no sistema GC×GC-FID. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma por 16 min; período de modulação de 6 s; vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 100 Hz temperatura do injetor e detector 250 °C; conjunto de colunas 1; volume de injeção 1 µL..... 55
- Figura 14. Representação gráfica dos PC para diferenciação dos diversos tratamentos no preparo de biodiesel de soja por MPCA..... 56
- Figura 15. Cromatogramas adquiridos no sistema GC×GC-qMS para amostras de A = óleo de soja novo, B = óleo de soja envelhecido, C = óleo de soja recuperado, D = óleo de soja não processado; com o conjunto de coluna 1. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> por 16min até isoterma a 240 °C, período de modulação de 6 s; vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 25 Hz temperatura do injetor e da linha de transferência: 270, 250°C respectivamente, temperatura da fonte de íons: 230 °C; voltagem da multiplicadora de elétrons 0,75 kV, corte do solvente: 2 min; corte de família C16: 10-11 min, corte de família, corte de família C18 14.5-15 min. .... 58
- Figura 16. Cromatogramas adquiridos no sistema GC×GC-qMS para amostras de A = óleo de milho, B = óleo de girassol, C = óleo de canola, D = sebo bovino; com o conjunto de coluna 1. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> por 16 min até isoterma a 240 °C, período de modulação de 6 s; vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 25 Hz temperatura do injetor e da linha de transferência: 270, 250 °C respectivamente; temperatura da fonte de íons: 230 °C; voltagem da multiplicadora de elétrons 0,75 kV, corte do solvente: 2 min; corte de família C16: 10-11 min, corte de família, corte de família C18 14.5-15 min..... 59
- Figura 17. Cromatogramas de biodieseis de óleo de soja, A= envelhecido, B = novo adquiridos no sistema GC×GC-FID com um conjunto de coluna 1. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma por 16 min; período de modulação: 6 s; vazão, 0,6 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição: 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 °C..... 62
- Figura 18. Cromatogramas de biodieseis de óleo de soja, A= envelhecido, B = novo adquiridos no sistema GC×GC-FID com um conjunto de coluna 2. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma por 16 min;

período de modulação: 6 s; vazão, 0,6 mL min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição: 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 °C. ....	63
Figura 19. Cromatogramas de biodieseis de óleo de soja, A= envelhecido, B = novo adquiridos no sistema GC×GC-FID com um conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min <sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma por 16 min; período de modulação: 6 s; vazão, 0,6 mL min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição: 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 °C. ....	64
Figura 20. Representação gráfica dos PC para diferenciação de biodiesel de soja feita com óleo envelhecido e óleo novo por MPCA, para os três conjuntos de colunas. (A) Conjunto 1, (B) Conjunto 2, (C) Conjunto 3. ....	66
Figura 21. Gráfico de Q resíduos versus T <sup>2</sup> de Hotelling para as amostras de biodiesel de soja feitos com óleo de soja envelhecido e novo para os três conjuntos de colunas (A) Conjunto 1, (B) Conjunto 2, (C) Conjunto 3. ....	66
Figura 22. Representação gráfica dos pesos por MPCA para separação de biodieseis de soja feito com óleo novo e envelhecido por MPCA para um conjunto de coluna 1 (A) pesos positivos (B) pesos negativos. ....	67
Figura 23. Representação gráfica dos pesos por MPCA para separação de biodieseis de soja feito com óleo novo e envelhecido por MPCA para um conjunto de coluna 2 (A) pesos positivos (B) pesos negativos. ....	68
Figura 24. Representação gráfica dos pesos por MPCA para separação de biodieseis de soja feito com óleo novo e envelhecido por MPCA para um conjunto de coluna 3 (A) pesos positivos (B) pesos negativos. ....	69
Figura 25. Perfis cromatográficos de biodieseis de óleo de soja envelhecido analisados em diferentes conjuntos de colunas (A) conjunto 1, (B) conjunto 2, (C) conjunto 3. ....	70
Figura 26. Cromatogramas de biodieseis de diferentes matérias primas adquirido no sistema GC×GC-FID com o conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min <sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação 6 s; vazão 0,7 mL min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição: 100 Hz temperatura do injetor e detector: 250 e 275°C respectivamente; (A) óleo de canola, (B) óleo de girassol, (C) óleo de milho (D) sebo bovino, (E) óleo de soja recuperado. (F) soja não processada. ....	73
Figura 27. Representação gráfica dos PC para diferenciação de biodieseis feitos com diferentes matérias primas por MPCA. ....	74

Figura 28. Gráfico de Q resíduos versus $T^2$ de Hotelling para as amostras de biodiesel de diferentes matérias primas, avaliação de <i>outliers</i> ao 95 % de confiança. ....	74
Figura 29. Representação gráfica dos pesos para separação de biodieseis de soja feito com óleo novo e envelhecido por MPCA para um conjunto de coluna 3 (A) pesos positivos (B) pesos negativos. ....	75
Figura 30. Cromatograma de biodiesel de soja em diesel mineral S50, mistura B20 adquiridos no sistema GC×GC-FID, com o conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min <sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6 s; vazão 0,7 mL min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respetivamente. ....	78
Figura 31. Cromatograma de biodiesel de soja em diesel mineral S500, mistura B20 adquiridos no sistema GC×GC-FID, com o conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min <sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6 s; vazão 0,7 mL min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respetivamente. ....	78
Figura 32. Cromatograma de biodiesel de soja em diesel mineral S1800, mistura B20 adquiridos no sistema GC×GC-FID, com o conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min <sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6 s; vazão 0,7 mL min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respetivamente. ....	79
Figura 33. Cromatograma de biodiesel de milho em diesel mineral S500, mistura B20 adquiridos no sistema GC×GC-FID, com o conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min <sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6 s; vazão 0,7 mL min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respetivamente. ....	80
Figura 34. Cromatograma de biodiesel de girassol em diesel mineral S500, mistura B20 adquiridos no sistema GC×GC-FID, com o conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min <sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6 s; vazão 0,7 mL min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respetivamente. ....	80
Figura 35. Cromatograma de biodiesel de canola em diesel mineral S500, mistura B20 adquiridos no sistema GC×GC-FID, com o conjunto de coluna 3. Condições	

cromatográficas: 170 °C a 3 °C min <sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6 s; vazão 0,7 mL min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respectivamente.....	81
Figura 36. Cromatograma de biodiesel de uma mistura de soja, canola, milho e girassol em diesel mineral S500, mistura B20 adquiridos no sistema GC×GC-FID, com o conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min <sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6s; vazão 0,7 mL min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respectivamente.....	81
Figura 37. Perfil recuperado de uma mistura BXX biodiesel de óleo de soja e diesel mineral S50. ....	82
Figura 38. Perfil recuperado de uma mistura BXX biodiesel de óleo de soja e diesel mineral S500. ....	83
Figura 39. Perfil recuperado de uma mistura BXX biodiesel de óleo de soja e diesel mineral S1800. ....	83
Figura 40. Curva de calibração analítica, concentração de biodiesel de soja em óleo diesel S50 versus valores fornecidos pelo modelo do MCR-ALS. ....	84
Figura 41. Curva de calibração analítica, concentração de biodiesel de soja em óleo diesel S500 versus valores fornecidos pelo modelo do MCR-ALS. ....	84
Figura 42. Curva de calibração analítica, concentração de biodiesel de soja em óleo diesel S1800 versus valores fornecidos pelo modelo do MCR-ALS. ....	84
Figura 43. Concentração de biodiesel de soja em diesel S50 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v). ....	86
Figura 44. Concentração de biodiesel de soja em diesel S500 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v). ....	86
Figura 45. Concentração de biodiesel de soja em diesel 1800 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v). ....	86
Figura 46. Concentração de biodiesel de milho em diesel S50 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v). ....	88
Figura 47. Concentração de biodiesel de milho em diesel S500 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v). ....	89
Figura 48. Concentração de biodiesel de milho em diesel S1800 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v). ....	89

Figura 49. Concentração de biodiesel de girassol em diesel S50 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% v/v).....	91
Figura 50. Concentração de biodiesel de girassol em diesel S500 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% v/v).....	91
Figura 51. Concentração de biodiesel de girassol em diesel S1800 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% v/v).....	91
Figura 52. Concentração de biodiesel de óleo de canola em diesel S50 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% v/v).....	94
Figura 53. Concentração de biodiesel de óleo de canola em diesel S500 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% v/v).....	94
Figura 54. Concentração de biodiesel de óleo de canola em diesel S1800 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% v/v).....	94
Figura 55. Concentração de biodiesel misto em diesel S50 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% v/v).....	97
Figura 56. Concentração de biodiesel misto em diesel S500 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% v/v).....	97
Figura 57. Concentração de biodiesel misto em diesel S1800 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% v/v).....	97







# Capítulo 1: INTRODUÇÃO



## 1. Introdução

Os combustíveis fósseis (petróleo e seus derivados) vêm se tornando entraves de cunho econômico, agravados pelas crises internacionais da década de 70 do último século, provocando um movimento global para sua substituição por biocombustíveis como o biodiesel. O biodiesel é o nome genérico dado às misturas de ésteres metílicos de ácidos graxos, geralmente obtidos pela transesterificação de triglicerídeos de origem vegetal ou animal com os alcoóis correspondentes (metanol ou etanol), sob diversas condições e usando catalisadores variados, facultando assim o uso de óleos vegetais de origem diversificada como matéria prima. O uso de biodiesel tem sido apontado como uma boa alternativa, por exemplo, o uso de biodiesel pode diminuir a emissão de gases relacionados ao efeito estufa (hidrocarbonetos, monóxidos e dióxido de carbono), além de particulados e de poluentes atmosféricos como óxidos de enxofre em relação aos gases emitidos por combustíveis [1]. No Brasil a primeira iniciativa oficial significativa para o incentivo ao uso de óleos vegetais ou derivados como combustíveis remonta a 1980 com o “Programa Nacional de Produção de Óleos Vegetais para Fins energéticos” (Proóleo), criado pela Resolução nº 7 do então Conselho Nacional de Energia. Esse programa previa que, ao seu final, até 30% do óleo diesel fosse substituído por óleos vegetais. Já em dezembro de 2004, o Governo Federal lançou o “Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel” (PNPB), do qual faz parte a Lei nº11.097 (13/1/2005). Essa lei prescreve que será obrigatória a mistura de biodiesel ao óleo diesel vendido no mercado brasileiro; a proporção será de 2% (v/v) entre 2008 e 2013, constituindo-se o chamado B2, quando passará para 5% (B5), sendo possível mediante autorização e em caráter experimental a circulação de veículos abastecidos com misturas até B20 [2]. A adoção de Biodiesel como combustível para venda a varejo demandará a monitoração de sua qualidade e pureza assunto já regulado pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). A resolução ANP nº7, de 19 de março de 2008 [3], fixou as especificações de qualidade e pureza de biodiesel puro e as metodologias analíticas a serem empregadas, em sua maioria, métodos ASTM/ABNT já adotados para derivados de petróleo. A monitoração do teor em biodiesel nas misturas BXX (XX= teor em biodiesel como % v/v) depende da detecção e quantificação do biodiesel no óleo diesel mineral, utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa, mas por este método

era preciso um marcador isotópico obrigatoriamente adicionado pelos fornecedores ao biodiesel puro [4]. Essa abordagem já é adotada pela ANP no Programa Nacional do Monitoramento de Qualidade de Combustíveis (PMQC), mas tem alguns inconvenientes. Além da necessidade da importação, aquisição e adição do marcador (que é fornecido exclusivamente pela empresa britânica Tracerco), essa espécie poderia ser adicionada diretamente ao diesel puro, dificultando ou mesmo impossibilitando sua distinção das misturas BXX. Assim, metodologias analíticas que permitam determinar a composição das misturas BXX são extremamente úteis para o controle de qualidade desse combustível.

O óleo diesel mineral presentemente comercializado no país contém hidrocarbonetos parafínicos e aromáticos de  $C_9$  a  $C_{28}$  e é formulado a partir de frações diversas de petróleo bruto; sua faixa de destilação vai de  $140^\circ$  a  $380^\circ\text{C}$  [5]. Já o biodiesel é uma mistura menos complexa de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (majoritariamente de  $C_{16}$  a  $C_{24}$  saturados ou não) [6]. Já no caso especial do Brasil é mais razoável se referir a “biodieseis”, em vista da definição legal, na qual o biodiesel é qualquer “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores à combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil [3]”. Essa definição é propositalmente genérica, facultando o uso de óleos vegetais de origem diversificada como matéria prima. No Brasilé possível o uso de matérias primas como milho, girassol, canola, soja(atualmente o insumo mais importante e com produção em escala compatível com a demanda em potencial, sendo esta de aproximadamente 85%),além de óleos vegetais e também gorduras animais,assim como descartados após uso domestico [7]

Existem diferenças bastante significativas entre os biodieseis feitos dessas diversas matérias primas; a Tabela 1 lista as concentrações dos ácidos graxos mais importantes tipicamente presentes em alguns óleos vegetais usados na produção de biodiesel [6].

**Tabela 1. Teores (% m/m) em ácidos graxos de óleos vegetais para produção de biodiesel [6]**

Ácido	Caprílico C <sub>8:0</sub>	Cáprico C <sub>10:0</sub>	Laurico C <sub>12:0</sub>	Mirístico C <sub>14:0</sub>	Palmitico C <sub>16:0</sub>	Esteárico C <sub>18:0</sub>	Oleico C <sub>18:1</sub>	Linoléico C <sub>18:2</sub>	α-linolênico C <sub>18:3</sub>	Araquídico C <sub>20:0</sub>
Óleo										
Milho	nd	nd	nd	nd	11,67	1,85	25,16	60,60	0,48	0,24
Canola	nd	nd	nd	nd	3,49	0,85	64,40	22,30	8,23	nd
Soja	nd	nd	nd	nd	11,75	3,15	23,26	55,53	6,31	nd
Girassol	nd	nd	nd	nd	6,08	3,26	16,93	73,73	nd	nd

Dependendo da origem vegetal, poderão ser produzidos biodieseis com composição bastante diversa, com uma maioria de ácidos graxos da família C18. Assim, a complexidade do biodiesel nacional será associada à sua composição química, mais que à gama de diferentes produtos caracterizáveis como biodiesel. Entretanto a grande diferença entre os biodieseis de diferentes matérias primas pode estar nos compostos minoritários, os quais não são detectados por métodos convencionais.

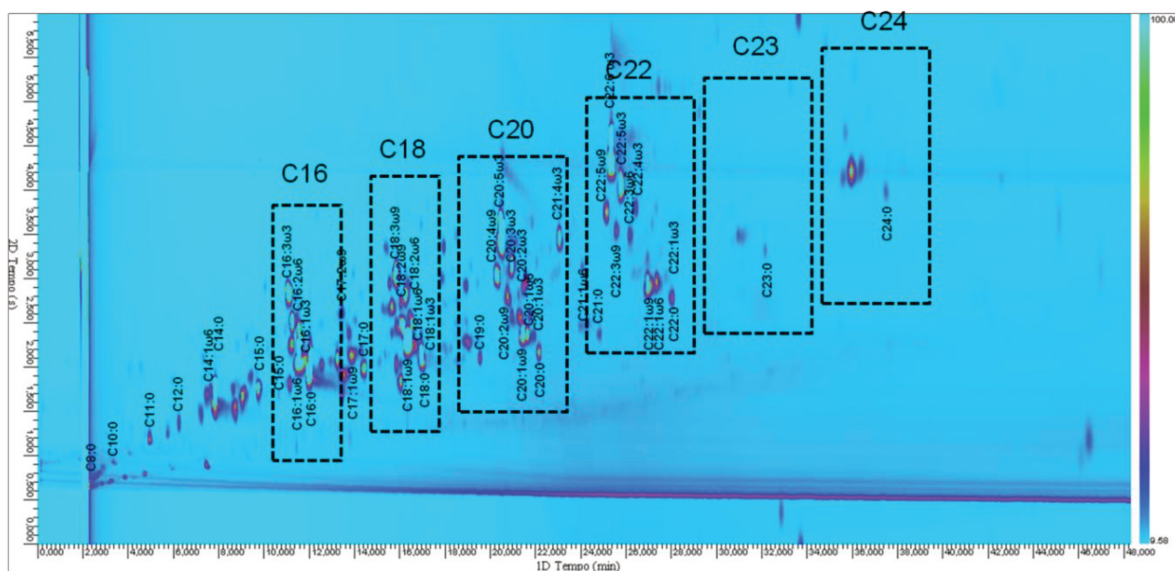
A quantificação de biodiesel em misturas com óleo diesel ainda não foi extensivamente abordada na literatura. Técnicas espectroscópicas, como espectrometria de absorção no infra-vermelho próximo (NIR) [8],[9], espectrometria Raman [10] e espectrometria de massas [11], além de métodos radioquímicos [12], tem sido eventualmente propostos para a análises dessas misturas. O uso de métodos baseados em cromatografia líquida e gasosa também tem sido descritos e parecem ser potencialmente mais interessantes. Pinto e colaboradores [13] descreveram um método para quantificação indireta de biodiesel de soja em suas misturas com óleo diesel usando Cromatografia Gasosa com detecção Espectrométrica de Massas (GC-MS), através da determinação de linolenato de metila em cromatogramas obtidos com monitoração de íons selecionados. Foglia e colaboradores [14] usaram Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinar os teores em biodiesel de soja, colza e de gordura animal em suas misturas com diesel, ajustando as condições cromatográficas para que os ésteres metílicos dos ácidos graxos (*FAME, fatty acid methyl esters*) co-eluem em um único pico, a ser integrado e relacionado à concentração de biodiesel. O único método padrão oficial para essas determinações, do Comitê Europeu de Padronização [15], usa GC para a determinação de FAME associáveis ao teor em biodiesel, mas após do seu isolamento da amostra por SPE (*Solid Phase Extraction*) o que é obviamente pouco adequado em determinações de rotina.

Se bem quantificar o biodiesel não é muito difícil já que não é uma amostra muito complexa, a quantificação de biodiesel em misturas BXX com óleo diesel mineral torna-se mais complexo, pois são comuns as coeluições importantes de compostos característicos do biodiesel(marcadores) com alcanos saturados provenientes do diesel mineral tais como C18:0 com C25, C18:3 com C26 e C20:0 com C27 [16].

Portanto uma alternativa que pode ser extremamente interessante para a caracterização de misturas biodiesel/diesel é a Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC). Nessa técnica, descrita originalmente por Liu e Phillips [17], usa-se cromatógrafos a gás convencionais modificados, com duas colunas capilares conectadas em série adaptadas por uma interface moduladora entre ambas controladas por um programa adequado. O modulador é o dispositivo responsável pela coleta, reconcentração e re-injeção contínua e periódica de frações do eluato da primeira coluna na segunda coluna. Os conjuntos de colunas típicos em GC×GC consistem em uma coluna capilar convencional conectada a um pedaço curto (< 2 m) de outra coluna capilar (d.i.≤ 0,1 mm), curta o suficiente para que o material coletado e re-injetado seja completamente eluído antes que a próxima fração seja nela introduzida. É altamente desejável (mas não imprescindível) que as fases estacionárias das colunas sejam diferentes, de forma que os mecanismos de separação sejam ortogonais entre se, portanto espécies co-eluídas na primeira etapa podem ser separadas na segunda eluição [18], pois os mecanismos de separação das etapas são diferente se, portanto, ortogonais [19]. Se a capacidade de picos (numero máximo de picos separáveis) da primeira e da segunda coluna forem, respectivamente,  $n_1$  e  $n_2$  picos, a capacidade total de resolução de um sistema bidimensional será incrementado geometricamente para  $n_1 \times n_2$  picos.

A representação dos cromatogramas em GC×GC difere dos apresentados em GC, pois a partir do registro do sinal do detector e conhecido o período de modulação (intervalo constante de tempo de cada ciclo de modulação, da ordem de alguns segundos) pode-se construir cromatogramas tridimensionais Sinal x Tempo na 1<sup>a</sup> coluna ( $^1t_R$ ) x Tempo na 2<sup>a</sup> coluna ( $^2t_R$ ), normalmente representados por superfícies de respostas com escalas cromáticas de sinal (diagrama de cores). A figura 1 mostra um cromatograma típico obtido em GC×GC-FID para uma amostra de óleo de peixe, onde são visíveis diversos eluatos correlacionados perfeitamente resolvidos (manchas no

fundo azul) e que co-eluiriam em uma análise de GC convencional. Esta separação é realizada na primeira dimensão (apolar) por pressão de vapor na segunda dimensão (polar) por pressão de vapor e interações moleculares, resultando assim um quadro claro da composição e diversidade da amostra perfeitamente estruturada. Sendo esta uma característica única e poderosa de GC×GC, a estruturação dos cromatogramas, claramente visível onde substâncias relacionadas estruturalmente (séries homólogas, isômeros, etc) como são agrupadas em regiões claramente definidas. Neste caso a estruturação é valiosa para a identificação dos analitos, sendo facilmente discernida por mera inspeção visual do cromatograma, o que fornece um recurso simples e rápido para a identificação de amostras complexas.



**Figura 1.** Cromatograma de óleo de peixe adquirido no sistema GC×GC-FID. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C·min<sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma a 240 °C por 25 min; período de modulação: 6 s; vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição: 100 Hz; introdução da amostra: SPME; temperatura do injetor e detector 250 °C; conjunto de colunas: HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) e SPWax (1 m × 0,1 mm × 0,1 µm) [20].

Alguns estudos descrevendo a aplicação de GC×GC à caracterização de biodiesel e suas misturas com óleo diesel já foram descritos. Hennion e colaboradores [21] estudaram a separação e quantificação de BXX usando GC×GC e demonstraram que inspecionando as razões relativas entre as concentrações dos FAME é possível a identificação da origem do biodiesel nessas misturas e sua posterior quantificação, sendo de melhor inspeção a mistura BXX pela alta capacidade de separação do sistema bidimensional. Seeley e colaboradores [22] buscaram usar um sistema GC×GC-FID para quantificar biodiesel de soja em misturas de B1 a B2, foram



comparadas as composições de biodieseis puros de colza, babaçu, girassol, amendoim, coco e gorduras de frangos e porco. Para a quantificação de biodiesel de soja, as áreas dos picos correspondentes aos FAME derivados de C<sub>16</sub> e C<sub>18</sub> foram integradas, tendo sido obtida uma precisão de 2,0 % (expressada como estimativa do desvio padrão relativo, RSD) para uma mistura B20. Porém como apontado pelos autores, a variabilidade na composição dos biodieseis puros de origem diversa faz com que a quantificação destes e em especial dos derivados de matérias primas tropicais seja mais complexa mesmo usando GC×GC, isto devido à quantidade de informação contida nos cromatogramas tridimensionais gerados, que são conjuntos de dados extremamente grandes e complexos, cuja interpretação usando estratégias convencionais é muito difícil, ou mesmo impossível e, portanto para a completa exploração do potencial desta técnica se faz necessário o uso intensivo de ferramentas quimiométricas de análise de dados [23].

Desde o início, a linha de pesquisa de Técnicas Cromatográficas Multidimensionais desenvolvida no LCGC tem sido conduzida em estreita colaboração com o Prof.Dr. Ronei J. Poppi (Laboratório de Quimiometria em Química Analítica, LAQQA/IQ Unicamp), onde são desenvolvidos e validados métodos combinando GC×GC-FID e técnicas multivariadas de deconvolução tais como métodos de análise exploratória (MPCA) e métodos de resolução de curvas (MCR), utilizados neste trabalho.

Em vista das considerações anteriores espera-se que estes métodos possam ser empregados como ferramentas para caracterização, identificação e quantificação de biodiesel puro e em misturas com diesel mineral BXX.

# Capítulo 2:

# OBJETIVOS



## 2. Objetivos

O objetivo geral desse trabalho foi:

- i) Desenvolver e estudar técnicas para caracterização de biodieseis puros e de suas misturas com óleo diesel mineral.

Os objetivos específicos foram:

- ii) Determinar as condições operacionais ótimas para análises de biodieseis puros e misturas BXX por GC×GC-FID e GC×GC-qMS.
- iii) Estabelecer padrões cromatográficos característicos em GC×GC-FID para biodieseis de óleo de soja, óleo de milho, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de soja recuperado após do seu uso doméstico e sebo bovino.
- iv) Desenvolver metodologias usando GC×GC-qMS para identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos com maior impacto na diferenciação de biodiesel de diversas fontes.
- v) Desenvolver metodologias usando GC×GC-FID para identificar e quantificar os teores em biodiesel de misturas BXX obtidas a partir dos materiais estudados.



## Capítulo 3:

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Biodiesel

O biodiesel é definido como uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos de materiais biológicos tais como óleo vegetal (por exemplo soja, colza, girassol, óleo recuperado e gorduras animais) [24]; sendo renovável, representa uma das alternativas ao combustível diesel do petróleo convencional. Quimicamente os óleos vegetais e as gorduras animais encontra-se constituído por moléculas de triglicerídeos, compostos glicerol por três ácidos graxos de cadeia longa que se ligam a uma molécula de glicerol. Por ligação éster, estes ácidos graxos diferem em comprimento de cadeia carbonada, e em orientação e a posição das duplas ligações nestas cadeias. Por outro lado, o biodiesel refere-se aos ésteres alquílicos menores e aos ácidos graxos que são sintetizados pela transesterificação de ácidos graxos com álcoois inferiores [25] resultando uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (*fatty acid methyl esters, FAME*).

#### 3.2 Importância do Biodiesel

A fonte de energia mais utilizada no mundo inteiro para alimentação de motores diesel (petróleo) é cada vez maior, no entanto, suas desvantagens são muitas como é o caso dos altos preços e dos efeitos de poluição da atmosfera. Por isto, o biodiesel esta ganhando popularidade no mundo inteiro, alguns países estão adotando uma nova estratégia que explora as vantagens comparativas a utilizar misturas biodiesel-diesel. Vários estudos têm mostrado que misturas de biodiesel podem levar a uma redução no fumo e em emissões de partículas de CO<sub>2</sub>, CO, de 67 %, 48 % e 47 % respectivamente [26], embora seu uso aumente um pouco as emissões de nitrogênio [27].

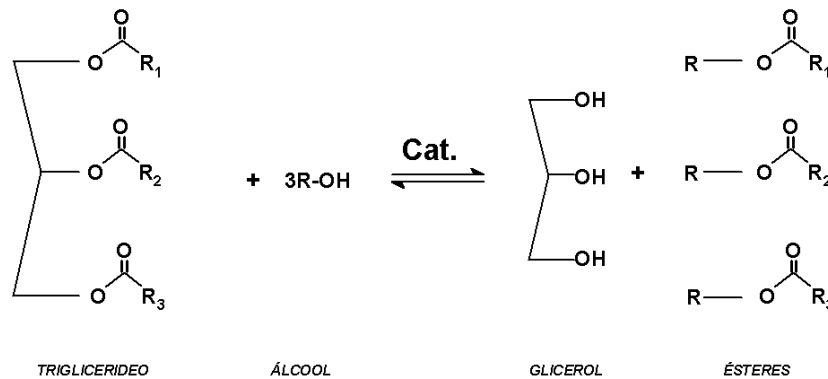
Outra vantagem significativa é que todas as misturas de biodiesel têm uma maior eficiência térmica do que o diesel alcançando assim um melhor desempenho. A concentração de 20 % biodiesel foi considerada como aquela de maior eficiência, portanto, B20 é recomendado como uma combinação ideal para o funcionamento de motores diesel em longo prazo [28].



### 3.2.1 Processo de preparo básico de biodiesel

A maior parte do biodiesel é obtida a partir de óleos comestíveis uma vez que estes têm a menor quantidade de ácidos graxos livres, o que aumenta consideravelmente a conversão dos triglicerídeos frente ao metanol, com uso de um catalisador alcalino. Assim um dos processos básicos para produzir biodiesel é a transesterificação nos triglicerídeos presentes em matérias primas como óleos e gorduras vegetais com um álcool de cadeia pequena. Produzindo ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos.

O óleos e gorduras vegetais são compostos por triglicerídeos com pequenas quantidades de mono e diglicerídeos [29], a reação de transesterificação requer três moles de álcool e um de triglicerídeos para produzir três moles de ésteres de ácidos graxos alquílicos e um mol de glicerol [30]. A figura 2 mostra a reação de transesterificação para a formação de biodiesel.



**Figura 2.** Transesterificação de triglicerídeos [31].

O metanol e o etanol são os alcoóis mais utilizados, especialmente o metanol por causa do seu baixo custo e vantagens físicas e químicas (álcool polar de menor cadeia que proporciona facilidades cinéticas à reação) [32]. Após a reação, a glicerina é separada por decantação ou centrifugação [33]. O processo de transesterificação resulta em uma mistura de ésteres alquílicos de cadeia curta dos ácidos graxos diferenciados. Definindo-se a composição destes óleos os ácidos graxos podem ser monitorados em qualquer mistura [33].

### 3.2.2 Reações de transesterificação para a produção do biodiesel

O primeiro passo nas reações de transesterificação envolve o ataque do íon alcóxido ao carbono do carbonilo da molécula do triglicerídeo, resultando na formação de um intermediário tetraédrico. A reação do intermediário com um álcool produz o íon alcóxido na segunda etapa. Na etapa final, o rearranjo do intermediário tetraédrico dá origem a um éster e aos diglicerídeos [34].

Uma reação secundária bastante desfavorável é dada quando certa parte dos ácidos graxos não são saponificados e reagem com o catalisador alcalino adicionado, formando-se um sabão. Como resultado, parte do catalisador é neutralizado e, portanto, não está mais disponível para a transesterificação [29].

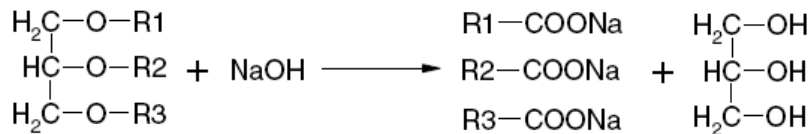


Figura 3. Reação de saponificação [29]

Além disso, o catalisador hidróxido de sódio ou potássio pode reagir com o álcool formando, esta reação é indesejável porque a água pode reagir com os triglicerídeos, ácidos graxos, ésteres e facilitar a hidrólise em uma seguinte saponificação [29].

### 3.2.3 Variáveis mais importantes no preparo de biodiesel:

As variáveis mais importantes que devem ser controladas na preparação do biodiesel são as seguintes:

- **Tipo de catalisador e umidade:** Se o óleo contém elevado teor de ácido graxo livre, os catalisadores ácidos são os mais adequados, tais como  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ou ácidos orgânicos, como o sulfônico, no entanto quando o teor de ácidos graxos livres não é considerável, catalisadores como alcóxido e metóxido de sódio são particularmente mais eficientes, embora  $\text{KOH}$ ,  $\text{NaOH}$  e carbonato de potássio também possam ser utilizados. No entanto, estes últimos tem como desvantagem, a possibilidade de conduzir a hidrólise de alguns ésteres, resultando em sabão e levando à baixa formação de ésteres [35]. Mesmo assim a transesterificação com

estes álcoois ocorre cerca de 4000 vezes mais rápida que em presença de um catalisador ácido na mesma proporção [36]. Em geral os catalisadores básicos são melhores que os ácidos porque a reação é mais rápida [37], em contrapartida, no processo de transesterificação, um catalisador alcalino pode provocar a formação de uma emulsão, aumentando a viscosidade da solução tendo como resultado o consumo do catalisador. É muito importante que a solução do catalisador e do álcool sejam utilizadas de imediato para evitar a absorção de umidade e assim manter a atividade do catalisador [38]. Além disso, o catalisador deve ser conservado em ambiente com baixa umidade (anidro), já que seu contato com o ar pode diminuir a sua eficiência através de interações com a umidade e com o  $\text{CO}_2$  [25]. Outro catalisador que recebeu uma especial atenção pela vantagem de ser mais barato e provir de uma fonte de hidróxido de cálcio é o  $\text{CaO}$  [39] reportando conversões superiores a 95 %. Este catalisador pode se regenerar com reativação térmica para eliminar o envenenamento principal da sua superfície, além disso, variações no tipo de catalisador e na reação de transesterificação também podem ser atribuídas à natureza química dos diversos óleos [40].

- **Concentração do catalisador:** A presença de um catalisador acelera significativamente o ajuste do balanço do equilíbrio, com catalisadores como o hidróxido de potássio ou sódio observou-se que o rendimento dos ésteres metílicos foi pequeno quando a quantidade de catalisador era baixa, mas aumentou quando a quantidade do catalisador era maior. O rendimento ótimo observado foi de 1,0 % m/m, dando o melhor rendimento e viscosidade dos ésteres formados [38],[41], mesmo assim usar concentrações mais altas que 1,0 % diminui a produção dos ésteres metílicos e não resulta uma boa separação das fases, além da possibilidade de formação de sabão devido ao excesso de catalisador [42].
- **Efeito da proporção álcool/óleo:** A transesterificação é uma reação de equilíbrio onde o excesso de álcool é necessário para produzir a reação com um máximo de conversão, mas para relações maiores que 15:1, a separação da glicerina torna-se difícil [38]. O aumento na proporção de metanol ocasiona uma interferência na separação da glicerina por causa de um aumento da solubilidade desta [42],

assim, quando a glicerina permanece em solução, ajuda a impulsionar o equilíbrio no sentido da diminuição da produção de ésteres [38]. Indica-se que uma proporção molar de 6:1 resulta em um maior rendimento de ésteres [43],[44].

- **Efeito da temperatura de reação:** Com temperaturas menores que 40 °C, houve uma formação lenta de ésteres metílicos, exigindo um período mais longo para a reação ser concluída. A temperatura ótima foi de 60 °C observando-se uma formação rápida dos ésteres metílicos [42]. Aumentando ainda mais a temperatura para 65 °C, observa-se um efeito negativo sobre a conversão [45].
- **Efeito da velocidade da agitação:** Uma reação com agitação aumenta a área de contato entre o óleo, álcool e o catalisador, e assim a reação ocorre mais rapidamente [46]. Devido a este efeito, observou-se que a maior conversão é obtida em uma faixa de agitação entre 400-600 rpm e a menor eficiência foi observada com 800 rpm, já que velocidades muito altas favorecem a formação de sabão, devido ao comportamento inverso da reação de transesterificação [47],[48]. Portanto, intensidades de misturas elevadas requerem períodos mais curtos de reação.
- **Tempo de reação:** Em relação ao tempo de reação, observou-se que 80 % da conversão é realizada nos primeiros 30 minutos e após uma hora (1 h), foi observada uma mudança significativa no rendimento de ésteres [37].
- **Separação de biodiesel:** Após a conclusão da reação, a solução é mantida por aproximadamente 12 h, quando a camada de biodiesel e glicerol se assentam e a mistura catalisador álcool se deposita no fundo devido à maior densidade em relação ao biodiesel, depois a camada superior é recolhida para sua purificação e lavagem [49].
- **Purificação e separação:** A fase superior consiste em ésteres metílicos com pequenas quantidades de impurezas tais como álcool residual, glicerol e glicerídeos parciais, enquanto a fase inferior contendo glicerina e outros materiais (água, sabão em excesso de álcool, catalisador, alguns ésteres metílicos e glicerídeos parciais).

Após a sua separação, a fase superior pode ser purificada por meio da remoção de metanol a 80 °C, o catalisador restante o metanol e o glicerol são removido por lavagens sucessivas com água destilada. A água residual é removida por secagem com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> seguido de filtração [50]. Outro método para purificação do biodiesel é lavar com abundante água destilada aquecida a 60 °C até que a água de lavagem tenha um pH semelhante à da água destilada, depois pode-se secar sob pressão reduzida a 70 °C [38]. Também a fase dos ésteres pode ser lavada com uma solução de 0,5 % de HCl e com água destilada para proporcionar um biodiesel puro, após é realizada a secagem com sulfato de magnésio seguido de filtragem a vácuo [29]. Um método mais simples para a purificação dos ésteres metílicos é a lavagem com água salina ao 10 % e posterior secagem com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [51].

No entanto, este tipo de preparo de biodiesel tradicional é muito demorado, demandando assim vários dias para preparar uma amostra em função disso, para esta pesquisa foi desenvolvido um novo método de preparo miniaturizado de biodiesel, com uso de ultrassom. Esta metodologia reduz a quantidade de biodiesel produzido e o tempo de separação do mesmo [56]. Suas condições ótimas de trabalho são as seguintes:

#### ***3.2.3.4 Condições de reação para preparo de biodiesel com ultrassom:***

- **Concentração do catalisador:** Uma concentração de 0,5 % m/m de catalisador é suficiente para o início da reação de transesterificação [57],[58], e em comparação com o método convencional, tem-se uma redução de 25 % na quantidade de catalisador necessário para a reação [58].
- **Relação metanol/óleo:** Thanh e colaboradores [59] informaram um máximo de rendimento de 99 % com relações metanol/óleo de 5:1 e 6:1 [60],[61].
- **Tempo de reação:** Avramović e Olivera encontraram um rendimento de FAME maior do que 95 % [57] nos primeiros tempos de reação [61]. Aqui a maioria das cadeias de carbonos dos óleos não possuem mais de C16:0, estas cadeias curtas

de carbono de ácidos graxos têm menor impedimento estérico em comparação com as longas cadeias de carbono de ácidos graxos, e portanto, tem mais possibilidade de contato com o catalisador [62], portanto, reduzir o tempo de conversão aumenta a produção de biodiesel.

- **Frequência do ultrassom:** Entre 20 kHz e potência de 400 Watts[58].
- **Temperatura de reação:** Entre 20 °C e 40 °C, obteve-se que o melhor rendimento de reação a uma temperatura de 32 °C [57]. A temperaturas altas entre (65-70) °C resulta em uma reação lenta já que o ponto de ebulição do metanol é 64,7 °C e quando a temperatura de reação excede os 64 °C ocorre a volatilização do metanol reduzindo assim a taxa de conversão [63].

Todos estas variações são atribuídas à sonoquímica pelo efeito do colapso de bolhas de cavitação, aumentando a área de contato entre o catalisador e o óleo [64]. A produção de biodiesel em ultrassom possui vantagens como redução do tempo de processamento, da quantidade de álcool, do catalisador e do tempo de separação, assim como da temperatura de reação. Portanto este foi o método de preparo utilizado ao longo do trabalho.

### 3.2.4 Misturas biodiesel-diesel

O uso de óleos vegetais como alternativa de combustível começou a ser estudados no final do século XIX por R. Diesel, sendo utilizados na forma de óleo. Mas seu uso direto nos motores apresenta muitos problemas, como por exemplo, acúmulo de material oleoso nos bicos de injeção, queima incompleta do óleo, formação de depósitos de carvão na câmara de combustão, rendimento de potência baixo e liberação de acroleína (propenal), que é tóxica além de ter uma elevada viscosidade, o que reduz a atomização do combustível levando ao depósito do motor e espessamento do óleo [66],[67]. Há quatro soluções possíveis para o problema de viscosidade que são: (1) diluição do óleo, (2) emulsificação, (3) micropirolise e (4) transesterificação. Atualmente a mais aplicável para reduzir a viscosidade do óleo vegetal é a transesterificação (biodiesel) [68] Devido à sua perfeita miscibilidade, o biodiesel pode ser misturado ao diesel mineral em quaisquer proporções em motores do ciclo diesel

sem necessidade de adaptações [51]. Estas misturas definidas utilizam o símbolo BXX onde XX é a percentagem de biodiesel em (v/v) %. Sua aplicação como combustível alternativo em países da União Europeia vem crescendo a cada ano, sendo utilizado misturado com diesel (BXX) ou mesmo na sua forma pura (B100) [51]. O órgão regulamentador de derivados de petróleo e combustíveis no Brasil determinou que, no período de 2005 a 2007, o biodiesel fosse utilizado de forma facultativa, misturado ao óleo diesel mineral na proporção máxima de 2 % de biodiesel para 98 % de diesel, formando o chamado combustível B2. Sua adição ao óleo diesel nesta proporção passou a ser obrigatória em janeiro de 2008. A partir de 2013, esta proporção aumentará para 20 % (B20), com perspectivas de crescimento deste percentual para os anos seguintes [52]. A mistura mais usada hoje em dia é conhecida como B5, que contém 5 % de biodiesel. Este biocombustível é caracterizado como o diesel, mas não contém compostos perigosos, tais como compostos de enxofre, nitrogênio, aromáticos e policíclicos, além disso, pode ser utilizado em processos industriais e de transporte. O biodiesel abre oportunidades de emprego no campo [53] valorizando a mão de obra rural, bem como no setor industrial, onde valoriza a mão de obra especializada na produção do combustível. Entretanto, a demanda nacional na produção de óleos vegetais crescerá em 50 %, pois o Brasil consome cerca de 36 bilhões de L/ano de diesel e se misturar cerca de 5 % de biodiesel no petrodiesel, haverá uma necessidade de aproximadamente 3,5 bilhões de L/ano de óleo vegetal [54]. Para que o biodiesel seja usado como substituto do diesel mineral, é necessário garantir que a qualidade e as propriedades deste combustível sejam confiáveis e consistentes com os padrões de qualidade exigidos [55].

### **3.3 Técnicas de análises de biodiesel em diesel mineral:**

As técnicas são amplamente utilizadas na análise de componentes do biodiesel puro e em suas misturas com diesel mineral. O controle da reação de transesterificação e a determinação da concentração de biodiesel em diesel mineral são os parâmetros mais importantes em misturas BXX ésteres metílicos de ácidos graxos mono-alquílicos, ácidos graxos, glicerol e derivados de ácido são comumente analisados por cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), onde a

primeira tem sido a técnica mais amplamente utilizada devido à sua alta precisão para quantificação dos componentes minoritários em misturas BXX [69]. Vários métodos espectroscópicos e cromatográficos também têm sido utilizados para a análise de misturas de biodiesel incluindo infravermelho (IR), Ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$ ) e cromatografia gasosa bidimensional (GCxGC) [70]. O Comitê Europeu de Normalização estabeleceu um método padrão cromatográfico denominado EN14103 para a determinação de ésteres metílicos de ácidos linolênicos e metílicos [71]. Este método é comumente utilizado como referência ou base para muitos países; o objetivo desta Norma Europeia é determinar o teor de ácidos graxos de ésteres metílicos (FAME) para seu uso como biodiesel, utilizando GC e detector de ionização em chama para analisar o percentual de FAME na amostra, este método é aplicável para ácidos graxos que contêm de C14 a C24 [71]. No entanto, para determinar o nível de mistura de biodiesel no diesel, a cromatografia convencional parece ser pouco adequada devido à complexidade e composição do diesel [72].

### **3.3.1 Análise de biodiesel e misturas diesel/biodiesel por cromatografia gasosa convencional:**

A análise da qualidade de biodiesel realizada por GC é feita quantificando os compostos mais característicos no biodiesel também chamados de marcadores tais como os seguintes ésteres metílicos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), araquídico (C20:0), behênico (C22:0), lignocérico (C24:0), oleico (C18:1), erúcico (C22:1), linoleico (C18:2),  $\alpha$ -linolênico (18:3) [6]. A percentagem da composição deles varia entre biodieseis de diferentes matérias primas, e também pode mudar durante o armazenamento e manipulação, do biocombustível [64]. A análise de biodiesel em diesel mineral com cromatografia gasosa convencional fornece como resultado uma identificação destes ésteres com uma certeza razoável, especialmente quando a análise é feita com colunas específicas [73]. De modo geral, a separação de FAME pode ser realizada com três diferentes tipos de colunas: apolar [74], polar [75] e muito polar [76]. As fases apolares são comumente feitas com filmes de metilsiloxanas como SPB-1, SPB-5, HP-5, (95 % dimetil-5 % difenilpolixiloxana), DB-1, HP-1 (100 % dimetilpolisiloxana) [77], essas colunas tem como vantagens a elevada estabilidade térmica em uma ampla faixa operacional de temperaturas, facilitando, assim, as análises



de compostos com maior massa molar. Aqui, a natureza da separação é baseada essencialmente nas diferenças das pressões de vapor, portanto, os compostos insaturados eluem primeiro que os compostos saturados [76]. Nos primeiros trabalhos realizados para análises de ésteres de ácidos graxos em biodiesel foram feitos com o uso de colunas apolares, e para facilitar a análise, também realizou-se a separação do biodiesel do óleo diesel mineral em um cartucho de sílica, utilizando hexano ou éter etílico como solvente. Esta separação é seguida da derivatização das amostras (silição ou acetilação), e sua posterior análise é realizada com detectores de ionização em chamas (FID) [78]-[80]. Mais tarde, Li desenvolveu um método rápido para quantificação dos ácidos graxos de ésteres metílicos, sem necessidade de derivatização da amostra, demandando o uso de padrões internos (laurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico, ésteres linolênicos e heptadecanoato de metila), comparando seus tempos de retenção relativa [81]-[82] através de calibração e padronização externa. No entanto, mais tarde foi demonstrado que a pouca estabilidade do heptadecanoato de metila influencia nos valores do conteúdo dos ésteres, sendo assim foi descartado o uso do mesmo.

As fases estacionárias polares mais utilizadas são DBWax, Supercowax 10, Carbowax 20M (polietilenoglicol) [75], onde a separação é essencialmente por pressão de vapor e interações moleculares entre o analito e o filme da fase estacionária, aumentando a resolução do sistema e mantendo uma boa estabilidade térmica [83]. Vários trabalhos aplicaram este tipo de separação [29]-[81], e assim sua consequente quantificação com uso de marcadores. Recentemente estão sendo utilizadas colunas altamente polares, já que resultam em uma notável melhoria na resolução especialmente para os ésteres insaturados. Nestas a ordem de eluição é a seguinte: primeiro eluem os compostos saturados e por último os insaturados. No entanto, estas colunas têm uma grande desvantagem, já que sua estabilidade térmica é bem menor. Colunas como a CP-Sil 88 apresentam um uso de temperatura não maior de 225 °C [87]. Para eliminar este problema as colunas de cristal líquido, tem sido cada vez mais utilizadas, como a SIL-100 [16] que, além de sua grande polaridade, tem uma alta estabilidade térmica, obtendo também uma redução no tempo de análise em comparação com as outras colunas polares, como Supercowax-10. Consegue-se, portanto, uma melhor análise de biodiesel em diesel mineral, já que tem uma melhor

separação entre os alcanos saturados provenientes do diesel mineral e os ésteres metílicos provenientes do biodiesel, pela diferença de polaridade entre seus componentes. Neste caso, a maioria dos alcanos saturados eluem antes dos ésteres metílicos, com exceção do C27, que coelui com C16:0, C28 que encontram-se em baixas concentrações, o C29 que também coelui com C18:1 $\omega$ -9 e C30 que coelui com o C18:2 $\omega$ -6 [16].

A análise de biodiesel também pode ser realizada por GC acoplada com espectrometria de massas [88] sendo utilizados GC-qMS na sua maioria com detector de ionização em chama a 70 eV com faixa de varredura de massas de 70-1090 m/z [89],[90]. Também tem sido muito utilizado o GC-qMS de ions seletivo modo (SIM), escolhendo um fragmento para realizara análise só com os compostos marcadores do biodiesel [51], este último tipo de análise fornece um espectro de massas com todos os fragmentos de uma determinada molécula, desta maneira é possibilitada a detecção de alguns marcadores de biodiesel presentes no diesel mineral [51].

Embora de acordo com a UNI EN 14331, o procedimento padrão [91] para a elucidação do perfil de FAME em misturas de diesel é realizada usando um cromatografo de gases (GC) e uma coluna convencional Carbowax na convencional em. Pelo método de padronização interna o qual é apropriado para FAME de origem vegetal ou animal com comprimentos de cadeia entre C14 e C24 e concentração de diesel menor de 5 %, adicionando-se o C17:0 como padrão interno, quantificando-se e identificando-se os marcadores já antes mencionados. A grande desvantagem das análises de biodiesel em diesel por este método é que sendo esta uma amostra complexa, sua caracterização traz consigo a baixa detectabilidade de alguns marcadores e de outros compostos que podem ser característicos no biodiesel devido a sua baixa concentração, assim como coeluições dos marcadores com alguns alcanos saturados provenientes do diesel mineral.

### **3.4 Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC $\times$ GC)**

O objetivo geral das novas tecnologias para GC é viabilizar a separação, identificação e quantificação de forma rápida do maior número de constituintes em misturas complexas, usando equipamentos simples e robustos. O equipamento de cromatografia gasosa comercial convencional pode ser modificado com o uso de duas

colunas capilares conectadas em série, com adaptação de um modulador, em alguns casos, de um forno secundário situado dentro do forno do cromatógrafo, mas com controle independente de temperatura. O uso de reservatórios ou dutos para abastecimento do fluido criogênico tornam-se necessários assim como o controle de válvulas e outros sistemas mecânicos, sendo necessário um programa especializado para a transformação do sinal adquirido pelo detector em diagramas tridimensionais, onde a complexidade do tipo de programa empregado depende do tipo de detector. Com um detector MS o sistema torna-se mais complexo. No entanto, o sistema de GC×GC é essencialmente o mesmo que o de GC, talvez esse seja o grande atrativo da GC×GC o qual resulta um ganho significativo em resolução e detectabilidade, apenas por algumas modificações em um instrumento comercial já existente.

### **3.3.2 Colunas, capacidade de picos e ortogonalidade em GC×GC**

O conjunto de colunas típico para GC×GC é constituído por uma coluna capilar convencional com até 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,25 a 0,32 mm, conectada em série com uma coluna do tipo empregado para *Fast GC* ( $d_c \leq 0,1$  mm). Em princípio, qualquer tipo de fase estacionária pode ser usada na primeira dimensão, no entanto, para conseguir uma separação com mecanismo ortogonal (separação onde as duas colunas tem mecanismos de separação independentes), os dois conjuntos de colunas tem que ser de fases estacionárias diferentes. A combinação mais utilizada é não polar-polar no qual uma coluna possui fase estacionária de poli(dimetilsiloxano) na <sup>1</sup>D e polietilenoglicol na <sup>2</sup>D [19],[92].

Em um sistema de cromatografia convencional, a capacidade de pico é definida como a quantidade máxima de picos de uma amostra que podem ser completamente resolvidos [93]. Em sistemas multidimensionais em que os mecanismos são ortogonais, em teoria a capacidade de pico do sistema é o produto das capacidades das dimensões separadas. Se a primeira coluna tem uma capacidade de  $n_1$  e a segunda coluna de  $n_2$ , a capacidade de pico total é  $n_1 \times n_2$ , conseqüentemente o uso de sistemas multidimensionais, tais como GC×GC permite um aumento geométrico da capacidade de picos [17], aproveitando de melhor maneira o espaço de separação [94].

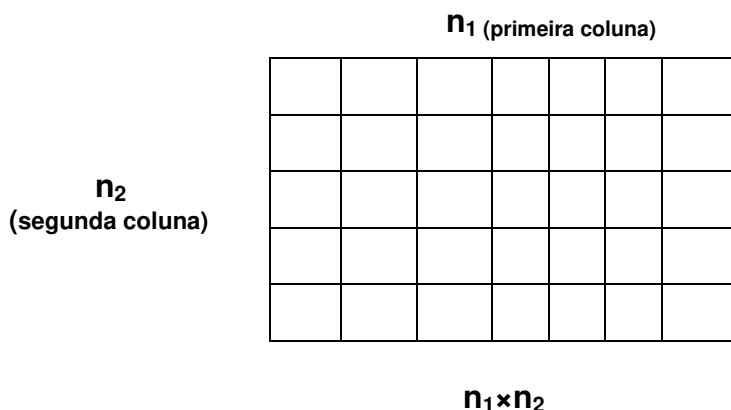


Figura 4. Representação gráfica da capacidade de picos em GC×GC [95].

Em um sistema ortogonal dito normal onde a <sup>1</sup>D é não-polar e seu mecanismo de separação é não seletivo, governado pelas pressões de vapor dos analitos, com fatores de atividade aproximadamente iguais, neste caso, a temperatura de eluição dos compostos é dada pela pressão de vapor e a sua relação com a temperatura [87]. Na segunda dimensão deste mesmo sistema, não há contribuição nenhuma do ponto de ebulição, apenas interações moleculares específicas entre o analito e a fase estacionária, criando-se diferentes coeficientes de atividade, os quais determinam o tempo de retenção [121] neste caso, a separação é muito rápida levando aproximadamente 1,10 s frente a 30-45 min que pode levar na primeira coluna. A separação nesta dimensão é de caráter isotérmico, resultando em picos muito estreitos com uma espessura de geralmente 100 ou 600 ms na linha base [96]. Portanto é necessário um detector que tenha uma taxa de amostragem  $\geq 100$  Hz, sendo que a maioria dos detectores por ionização de chama cumprem estes requisitos. Este processo de concentração e re-injeção é realizado com o sistema de modulação [87]. Com estes mecanismos de separação diferentes, oferece-se uma separação ortogonal. No entanto se propôs uma estimativa simples da ortogonalidade como a quantidade de espaço utilizado para a separação dos solutos retidos em comparação com o espaço vazio [95]. A consequência desta ortogonalidade é que os compostos são organizados de acordo a suas estruturas químicas, em outras palavras, tem-se um ordenamento em bandas e agrupamentos de membros de uma mesma família química, aumentando o poder de separação [87].

### 3.3.2.1 Estruturação

De acordo com a ortogonalidade da separação se organizam compostos em um plano estruturado construindo-se padrões reconhecíveis característicos de uma mistura e, portanto, uma fonte confiável de identificação adicional. Em um sistema comum de GCxGC (primeira dimensão apolar, segunda dimensão polar), tem-se no eixo vertical do cromatograma a polaridade do composto e no eixo horizontal a volatilidade (ponto de ebulição). Giddings [95] mostrou que a dimensionalidade de uma amostra é a quantidade mínima de parâmetros que são necessários para que seja observada a ordenação na separação de seus constituintes. Por exemplo, para a caracterização amostras complexas como derivados petroquímicos é observado que muitas vezes compostos alifáticos possuem temperaturas de ebulição próximas aos de compostos aromáticos, resultando em coeluição e dificilmente é observado algum padrão de separação em 1D-GC. Normalmente, são necessárias pelo menos duas variáveis independentes para especificar os membros de uma mistura e, portanto, duas dimensões para que sejam observados ordenamentos nos cromatogramas. Por isso, uma ferramenta exclusiva de técnicas cromatográficas multidimensionais, tal como GCxGC, é a estrutura cromatográfica, no qual compostos quimicamente semelhantes estão agrupados em “clusters”, facilitando a sua identificação visual e conferindo uma maior confiabilidade em sua identificação.

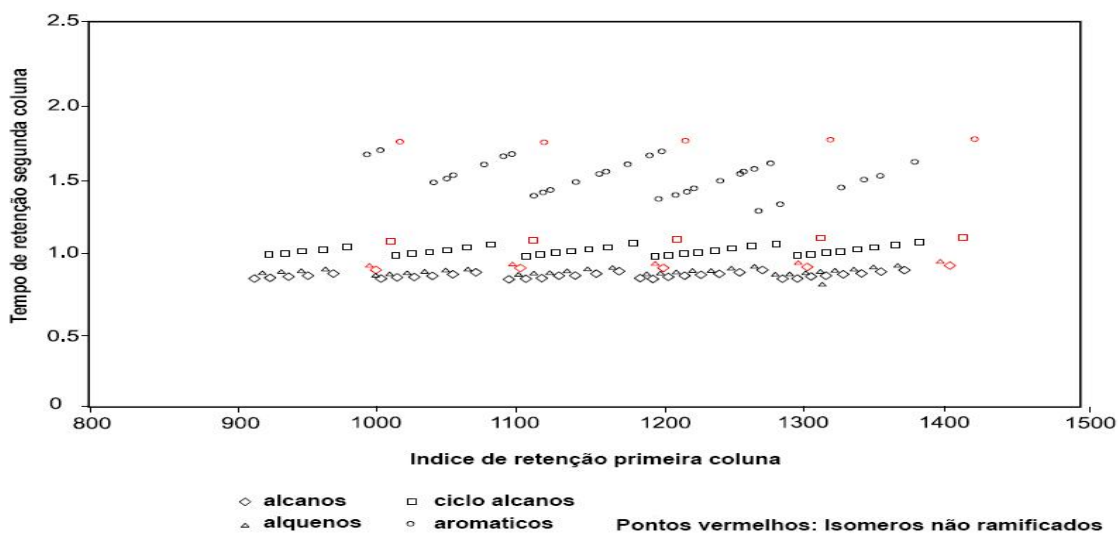


Figura 5. Agrupamento e estruturação de compostos quimicamente semelhantes em um cromatogramas bidimensional. [87].

### 3.3.4 Modulador

A operacionalização de separações bidimensionais em GC é bem mais complexa que as convencionais, já que a coleta de frações do eluato de uma coluna capilar e sua transferência para a segunda coluna sem perdas, contaminação ou alargamento excessivo da banda cromatográfica não são triviais. O componente fundamental, responsável pela coleta contínua de pequenas frações de eluato da <sup>1</sup>D, sua reconcentração em uma banda estreita e rejeição na <sup>2</sup>D é o modulador. Embora, existam diversos moduladores comerciais disponíveis, o funcionamento deles é essencialmente o mesmo: moduladores térmicos [17], moduladores baseados em válvulas [97] e moduladores criogênicos [98],[99]. Mesmo com a disponibilidade comercial de diversos moduladores, alguns usuários de GC confeccionam seus próprios moduladores e os programas computacionais para controlá-los[99],[100], Entretanto a modulação criogênica é a mais utilizada por ser rápida, eficaz e robusta (não tem peças móveis) [100]. O modulador criogênico, acumula e focaliza por meios criogênicos, coletando eluatos da <sup>1</sup>D por intermédio de jatos frios e jatos quentes diretamente sobre a coluna, remobilizando-os à temperatura original do forno com o objetivo de reinjetar os eluatos como um pulso estreito para a segunda dimensão. Estes jatos são controlados por válvulas instaladas fora do forno, elas são abertas e fechadas sincronizadamente, criando ciclos de modulação através do resfriamento alternado na <sup>2</sup>D, resultando em espessuras de bandas que têm pulsos de injeção da ordem de <10 a 200 ms. Devido à compressão das bandas cromatográficas decorrente da modulação e ocasionando um aumento significativo da detectabilidade. Ao invés de eluir como um pico largo e pouco intenso, cada analito elue como uma série de picos estreitos e intensos (altas relações sinal/ruído), sendo facilmente detectados[101].

Na figura 6, pode ser observado o fundamento do processo de modulação[19]

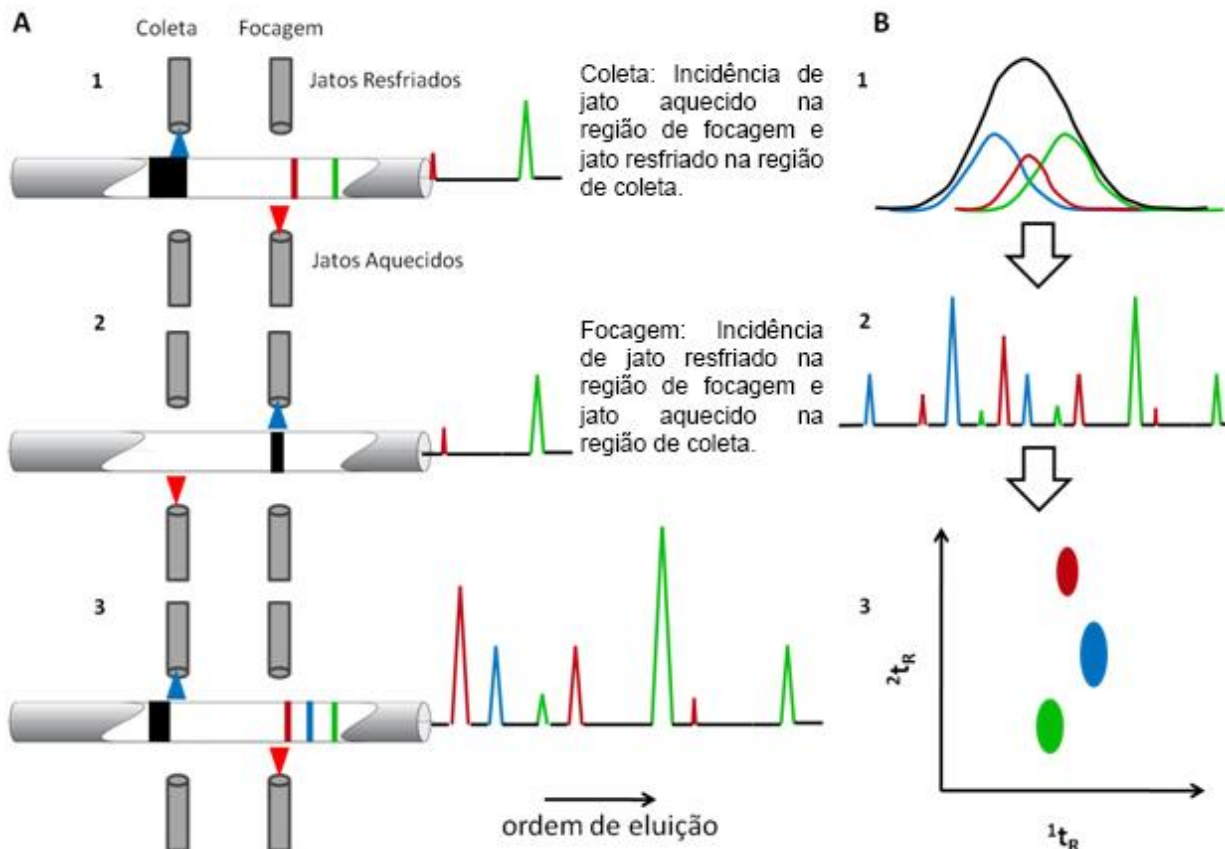


Figura 6. Ilustração do processo de modulação básico para um modulator de 4 jatos - 1. Etapa de coleta; 2. Etapa de focagem; 3. Reinício). B – 1. Ilustração de um pico cromatográfico composto por 3 analitos coeluídos; 2. Ilustração do pico cromatográfico modulado; 3. Visualização do cromatograma na forma de diagrama de contorno. Figura baseada em J. Dallüge et al. “Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography: a powerful and versatile analytical tool” J. Chromatogr. A 2003.[19], [20].

O processo de modulação criogênica dá-se da seguinte maneira:

- (1) Os compostos no efluente da primeira dimensão estão presos e centrados na seção fria na segunda dimensão.
- (2) Quando se interrompe o esfriamento esta fração remobiliza-se e se injeta como pulso estreito enquanto o material liberador da primeira coluna é parado temporalmente para não interferir com a injeção.
- (3) A repetição da etapa (1).

Após a modulação, os eluatos já separados chegam até o detector e a dada a representação gráfica dos cromatogramas que é bem diferente à apresentada em cromatografia convencional, o registro do sinal do detector em função do tempo em GC×GC é uma seqüência contínua e encadeada dos cromatogramas curtos para cada

fração eluída na  $2^{\text{D}}$ . Os detectores recebem os dados de forma contínua e o programa remodela-os em uma separação bidimensional, isto é possível conhecendo o período de modulação. Na figura 7, tem-se as representações cromatográficas de três compostos que coeluem na primeira dimensão e conseguem ser separados na segunda coluna[101]. A figura (A) consiste em três analitos não separados na  $1^{\text{D}}$ , esta é fracionada e separada na  $2^{\text{D}}$ , gerando o cromatograma (B). Cada cromatograma individual das frações pode ser destacado do cromatogramas bruto (C) e a partir deles construir um gráfico sinal  $\times$   $1^{\text{t}}t_{\text{R}} \times 2^{\text{t}}t_{\text{R}}$  como um diagrama tridimensional (D), diagrama de contorno (E), escalas cromáticas de intensidade de sinal ou diagramas de cores (F) [101].

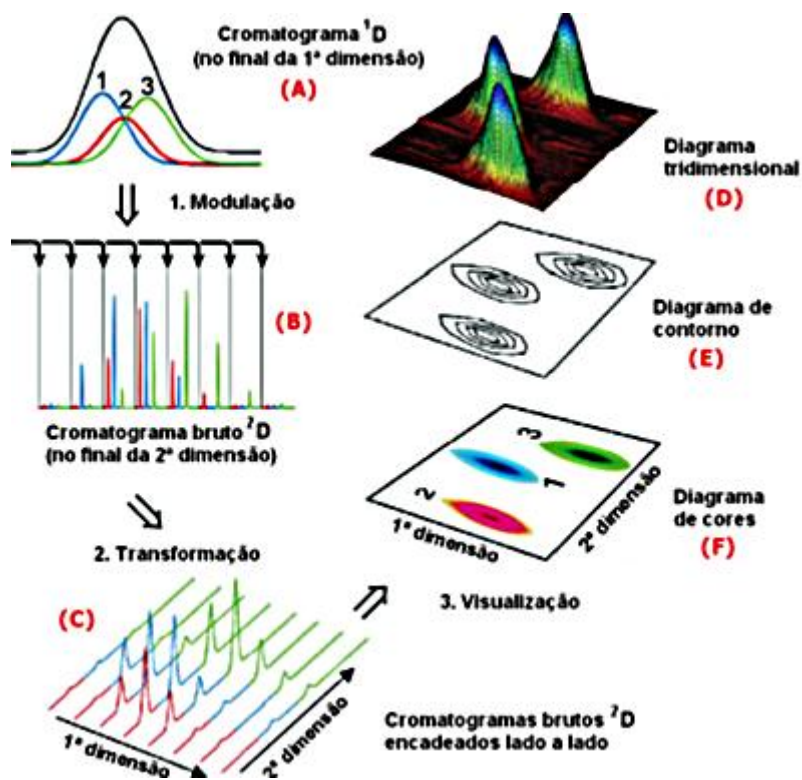


Figura 7. Geração e visualização dos cromatogramas em GCxGC [19].



### 3.3.5 Análises de biodiesel e misturas biodiesel/ diesel mineral por GC×GC.

A análise para caracterização e identificação de amostras de biodieseis de diversas fontes e suas misturas com diesel mineral, que foram realizadas com GC×GC e a norma EN 14103, conseguiram identificar uma grande quantidade de compostos com alta precisão em comparação com a GC, detectando compostos como C4, dificilmente vistos por GC, e separando a família de C18 com maior facilidade.

A quantificação é realizada de maneira individual para cada éster metílico, já que todas as amostras são bem separadas do diesel mineral [70], no entanto, um conjunto de colunas HP-5 e DB-Wax (conjunto normal) gera cromatogramas onde os ésteres metílicos de ácidos graxos do biodiesel ocupam uma região que também está povoada por numerosos alcanos cíclicos e monoaromáticos encontrados no diesel. Afortunadamente, as intensidades dos picos nos hidrocarbonetos derivados do petróleo são menos intensos, permitindo uma quantificação exata e direta dos ésteres no biodiesel [22]; mesmo assim é observado um solapamento parcial dos ácidos graxos C18:1 e C18:2 em cada dimensão, mas, em uma análise separada foi observado que a inversão das colunas (DB-Wax na primeira dimensão e HP-5 na segunda) melhora a separação individual destes FAME, no entanto, a resolução completa deles não é necessária para a quantificação. Para realizar a quantificação de biodiesel em diesel é realizada uma curva de calibração que contém diferentes concentrações de biodiesel desde 2 % até 20 % m/m com óleo diesel mineral e são empregados diversos ésteres metílicos como padrões e um padrão interno.

Para biodiesel de origem vegetal é preferível utilizar o heptadecanoato de metila (C17:0) e para o biodiesel de origem animal o decanoato de metila C10:0 [102] já que a maioria dos biodieseis de origem animal contém C17:0.

Obtendo assim uma curva com boa correlação. Para determinar a concentração de biodiesel nos combustíveis, aqui os FAME são integrados diretamente e a soma total dos mesmos será a percentagem de biodiesel no diesel mineral obtendo-se a concentração total do biodiesel na mistura [102].

É importante ressaltar que GC×GC permite a quantificação simultânea dos ésteres do biodiesel, dos hidrocarbonetos e aromáticos provenientes do diesel mineral, mas para estas análises é necessário que o conjunto de colunas a escolher seja o mais

adequado, o critério utilizado para a escolha do melhor conjunto é a resolução dos picos de séries homólogas de acordo com a primeira dimensão e a segunda dimensão.

A resolução entre dois picos adjacentes  $R_s(A, B)$  pode ser calculada com a equação (1) [103]. Mas em GC×GC, é necessário conhecer a separação dos picos em cada dimensão, onde a primeira dimensão é denominada  $R_{s,x}(A, B)$  e a segunda  $R_{s,y}(A, B)$ , as mesmas são calculadas nas equações as (2) e (3) respectivamente, finalmente a resolução entre dois picos adjacentes pode ser obtida a partir de uma aproximação do teorema de Pitágoras, equação (4) [104]. Sendo os termos  $t_A$  e  $t_B$  os tempos de retenção dos compostos A e B,  $\omega_A$  e  $\omega_B$  as larguras dos picos A e B respectivamente.

$$R_s(A, B) = \sqrt{\frac{4(t_A - t_B)^2}{(\omega_A + \omega_B)^2}} \quad (1)$$

$$R_{s,x}(A, B) = \sqrt{\frac{4(t_A - t_B)^2}{(\omega_{A,x} + \omega_{B,x})^2}} \quad (2)$$

$$R_{s,y}(A, B) = \sqrt{\frac{4(t_A - t_B)^2}{(\omega_{A,y} + \omega_{B,y})^2}} \quad (3)$$

$$R_{s,2D} = \sqrt{R_{s,x}^2 + R_{s,y}^2} \quad (4)$$

A melhor combinação do conjunto de colunas quando o biodiesel é de origem vegetal consiste em um conjunto com <sup>1</sup>D polar e a <sup>2</sup>D não-polar, obtendo uma melhora na resolução de 5 vezes em relação a uma coluna apolar na primeira dimensão. Resultando assim uma melhor estruturação, com os alcanos eluindo na parte superior e na parte inferior os aromáticos.

Realiza-se a quantificação individual dos ésteres de ácidos graxos e a quantificação dos hidrocarbonetos por família através da normalização da área total e fatores específicos de resposta para cada grupo (alcanos e ácidos graxos) em relação

ao tempo de eluição e o fator de resposta, as massas relativas de hidrocarbonetos e dos ácidos graxos, obtendo-se com a normalização das áreas totais e os fatores de resposta a quantificação simultânea do conteúdo de biodiesel e dos hidrocarbonetos provenientes do diesel mineral [104]. Na figura 8, é ilustrada a separação de FAME em um conjunto de colunas polar × não-polar.

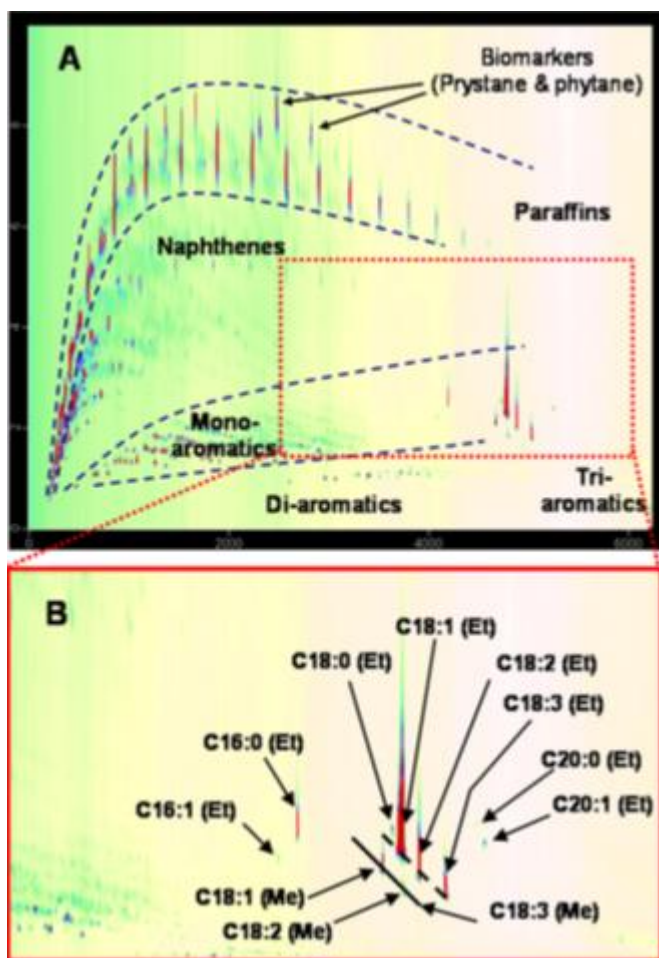
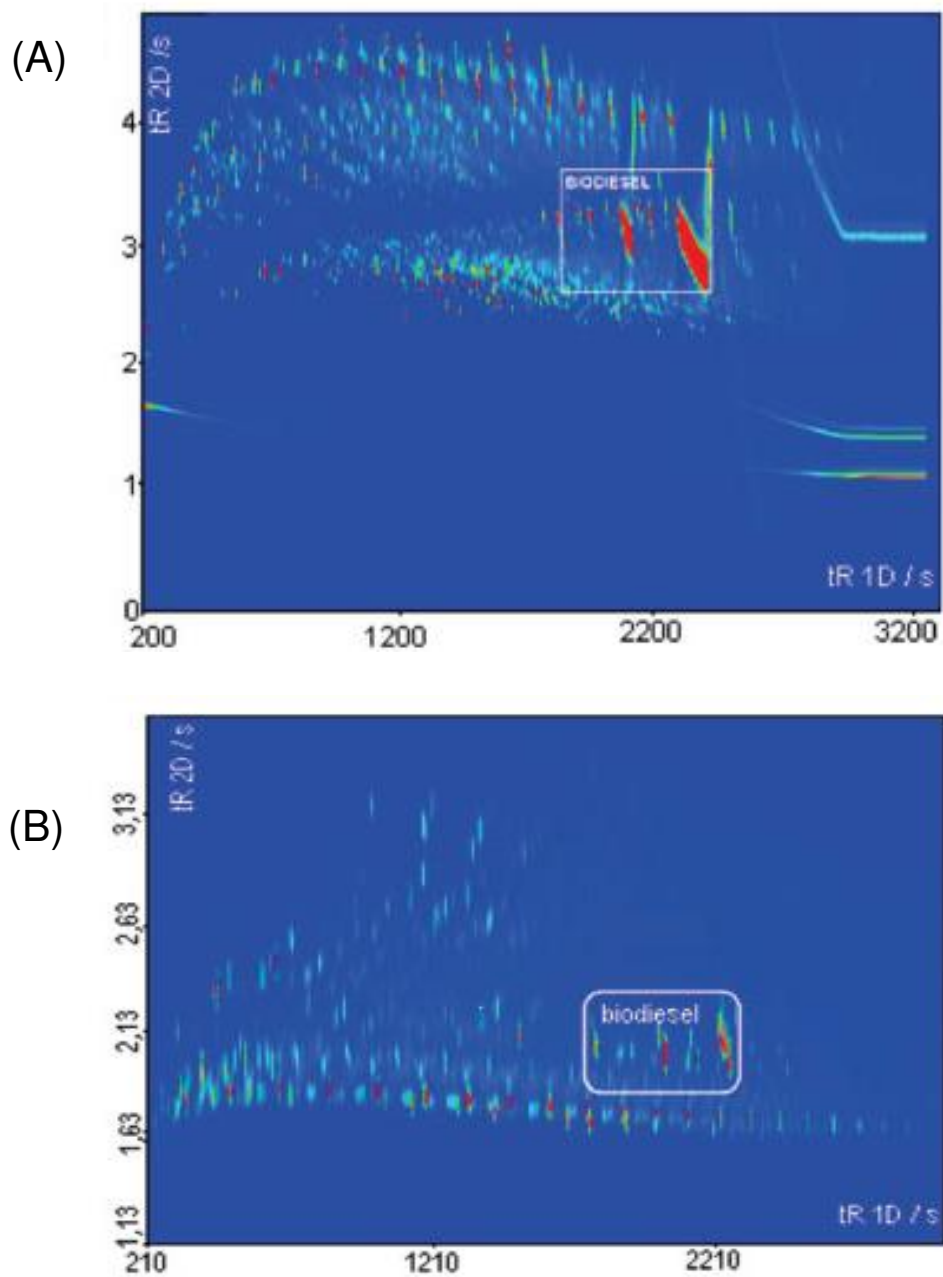


Figura 8. Ilustração da separação de FAME e hidrocarbonetos em amostras de diesel B5 em um conjunto de colunas polar × não-polar [104].

No entanto, foi reportado que quando o biodiesel é de origem animal a melhor combinação de coluna é o dito normal, <sup>1</sup>D não-polar e <sup>2</sup>D polar [102]. Isto pode ser observado na figura 9.



**Figura 9. Ilustração da separação de biodiesel de sebo bovino e hidrocarbonetos provenientes do diesel mineral em uma mistura B20 (A) Conjunto polar-apolar, (B) Conjunto apolar-polar[102].**

Graças ao grande poder de separação da GCxGC, e sua alta detectabilidade, qualquer análise com dados provenientes de técnicas multidimensionais

resulta mais laborioso, por tanto, esta grande quantidade de informação é melhor aproveitada através de técnicas quimiométricas.

### 3.3.6 Quimiometria em GC×GC

As separações multidimensionais proporcionam uma enorme quantidade de dados, por exemplo, em uma secção de menos de 45 min de um diagrama GC×GC de fumaça de cigarro foram visíveis mais de 30.000 picos [105]. E devido a essa complexidade tem sido desenvolvidos e comercializados programas que permitem a manipulação de grandes quantidades de dados utilizam a quimiometria, alguns já disponíveis, outros ainda em desenvolvimento. Recentemente, os softwares mais utilizados são o ChemStation da Agilent (Santa Clara, CA,USA) [106],[108],

O GC Solution ou GCMS Solution da Shimadzu (Columbia, MD, USA)[106], e o LabView de National Instruments, mas este último está desenhado para controlar instrumentos e o processamento de dados é feito utilizando uma linguagem de programação.

Um dos programas mais amplamente utilizado é o MatLab, este contém uma grande biblioteca para tratamento de dados úteis na análise de diversos analitos.

A otimização dos tratamentos quimiométricos para dados provenientes de GC×GC abarca a visualização, otimização do pré-processamento, classificação e calibração multivariada (quantificação). O critério para a escolha do algoritmo adequado depende da natureza dos dados e dos resultados esperados. Entre os mais utilizados estão: Análise de fatores paralelos (PARAFAC), Análise de componentes principais (PCA), resolução de curvas multivariadas (MCR), mínimos quadrados parciais(PLS) [106]-[115].

No entanto, antes de realizar qualquer análise, seja qualitativa ou quantitativa, deve ser aplicado um pré-processamento, para corrigir as flutuações aleatórias do sinal, do detector ou do instrumento [107]. Entre estes pré-processamentos tem-se a normalização da área, a subtração da linha base, o filtrado de ruídos e o alinhamento dos tempos de retenção [106]. O alinhamento nos tempos de retenção é um algoritmo que tem sido bem desenvolvido [109],[110]. Em 2004, reportou-se um alinhador que, através de correlações de deformação otimizada (*correlation optimized warping, COW*)

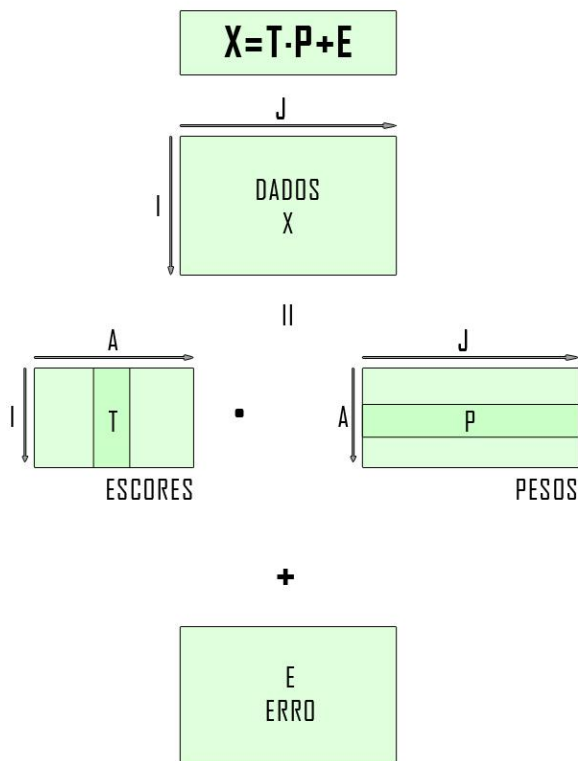
com uma faixa de janela e transformações afins com um cromatograma padrão, conseguiu alinhar uma ampla gama de cromatogramas em ambas as dimensões [111].

### **3.3.6.1 Análise Exploratória e GC×GC**

Uma ferramenta muito comum para classificação de amostras é a análise exploratória (análise de componentes principais, PCA) a qual indica as similaridades e as diferenças gerais nas amostras. O PCA agrupa aquelas variáveis que são altamente correlacionadas em uma nova variável chamada de componente principal direcionada ao longo do eixo de maior espalhamento dos dados segundo suas similaridades químicas. A figura 10 apresenta o esquema clássico da aplicação de PCA a uma matriz de dados de perfis vetorizados, uma lista de sinais químicos, picos, áreas, tempos de retenção entre outros parâmetros.

As matrizes obtidas pelas amostras analisadas em GC×GC quando são sobrepostas formam um cubo de dados que são classificadas como dados do tipo multimodos (*multi-way*) ou Análise de componente principal multimodo (MPCA), dito cubo de dados é a nova matriz a processar

O PCA é descomposto em duas matrizes, uma de escores e outra de pesos baseados em vetores próprios. Os escores são utilizados para a classificação das amostras, estes expressam as relações entre as amostras onde o usuário tem que ser capaz de assumir o agrupamento correto para determinar a diferença entre os perfis das amostras, e os pesos mostram as relações entre as variáveis [112].



**Figura 10. Decomposição da matriz de dados PCA, matriz de escores e pesos [111].**

Utilizado em dados de GC×GC os escores mostram o agrupamento entre amostras com propriedades químicas similares, os pesos indicam os componentes aos que são atribuídos pelo agrupamento das amostras, estes determinam a variância entre os picos. Regiões do cromatograma onde as áreas de pico aumentam indicam contribuições positivas, mas também pode ser visto como os picos comuns em todas as amostras com maior correlação para dita separação nos escores; as regiões do cromatograma onde as áreas de pico diminuem indicam contribuições negativas ou aqueles picos que são diferentes entre as diversas amostras que também contribuem na separação dos escores. Assim tanto os escores como os pesos são um conjunto que permite determinar a variação das amostras e identificar o composto que está variando, sendo útil na interpretação do significado químico das diferenças entre amostras e a relação molecular de misturas complexas [113],[114].

Johnson e Synovec conseguiram classificar amostras de combustível de avião de origem desconhecida, utilizando análise de componentes principais [115], distinguindo facilmente a composição dos combustíveis. Em 2006, o PCA foi utilizado para detectar

automaticamente as diferenças dos perfis de amostras na separação de metabolitos [116]. Shellie e colaboradores apresentaram um método para identificar os biomarcadores de metabolitos para a obesidade em amostras de tecido de ratos magros e obesos [117].

O PCA classificou amostras de petróleo com composição e origem diferente, além disso, conseguiu-se definir os compostos responsáveis pela separação [118].

### **3.3.6.2 MCR-ALS e GC×GC (Resolução de curvas multivariadas com mínimos quadrados alternados)**

A quantificação tradicional é realizada univariavelmente em GC através da integração convencional dos picos [119], no entanto, quando o objetivo é a quantificação de uma mistura complexa, o processo torna-se mais complicado.

O método de resolução multivariada de curvas foi desenvolvido pelo prof. Romà Tauler em 1995 [120]. Este método tem como grande vantagem o fato de que pode ser aplicado em dados de segunda ordem e possibilita a obtenção dos perfis experimentais puros de cada espécie utilizando mínimos quadrados alternados (ALS).

Matematicamente falando o método MCR é baseado no modelo bilinear da equação (5):

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (5)$$

O objetivo é a decomposição bilinear da matriz de dados  $\mathbf{D}$  nos perfis puros, associados à variação de cada contribuinte representado pelas matrizes  $\mathbf{S}^T$  e  $\mathbf{C}$  respectivamente. Por exemplo, em uma análise de óleo essencial em metanol por GC×GC, a matriz  $\mathbf{D}$  corresponde aos cromatogramas de cada amostra que é decomposta na matriz  $\mathbf{C}$ , contendo as concentrações relativas associadas aos perfis cromatográficos puros do óleo essencial e do metanol da matriz  $\mathbf{S}^T$ .  $\mathbf{E}$  é a matriz de resíduos que não é explicada pelo modelo e deve estar próxima do erro experimental.

O algoritmo de mínimos quadrados alternos calcula as concentrações das matrizes puras  $\mathbf{C}$  e  $\mathbf{S}^T$  nas misturas, a partir de uma estimativa inicial [122].

A equação (5) permite a análise simultânea de vários experimentos, onde os cromatogramas são resolvidos e os perfis de concentrações de cada um podem ser diferentes entre cada corrida. A equação (6) mostra o modelo para um sistema de  $n$  experimentos com dados nas matrizes  $\mathbf{D}^1$  até  $\mathbf{D}^n$  e um cromatograma puro em comum



$S^T$  e as matrizes de  $C^1$  até  $C^n$  com os perfis de concentrações relacionadas com as matrizes de dados.

$$\begin{bmatrix} D^1 \\ D^2 \\ D^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C^1 \\ C^2 \\ C^n \end{bmatrix} S^T + \begin{bmatrix} E^1 \\ E^2 \\ E^n \end{bmatrix} \quad (6)$$

Para otimizar o processo, várias restrições podem ser estabelecidas para modelar as matrizes  $C$  e  $S^T$  como não negatividade, unimodalidade, trilinealidade entre outras [120]-[123].

Na figura 11, tem-se um exemplo de como o algoritmo MCR pode se utilizar com GC×GC-FID, primeiro tem-se o desdobramento dos cromatogramas bidimensionais em um vetor, em seguida as amostras colocam-se nas linhas da matriz de dados bidimensional  $D$ , que se decompõe nas matrizes de concentração de perfis  $C$  e  $S^T$  de cada componente puro. Finalmente, após da otimização pelo método de mínimos quadrados alternados, os vetores obtidos na matriz  $S^T$  são reformados em duas dimensões GC×GC-FID e a curva de calibração pode ser construída utilizando os dados contidos na matriz com  $C$ .

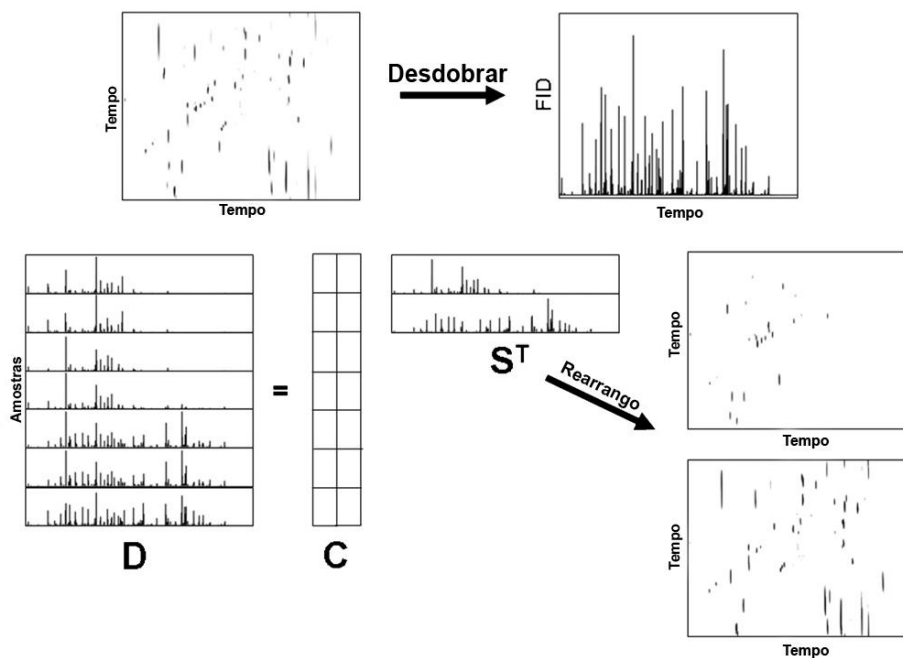


Figura 11. Esquema para análises de MCR-ALS de GC×GC-FID [124].

Lachenmeier e Kessler em 2008 utilizaram o MCR-ALS para a análise de aditivos em alimentos desenvolvida com técnicas cromatográficas para (1) identificar e determinar simultaneamente o (2) número de compostos químicos em uma mistura complexa e (3) quantificar cada componente [125]. Azzouz e Tauler aplicaram MCR-ALS para resolver e quantificar diferentes analitos em diversas amostras farmacêuticas e agrícolas. A recuperação simultaneamente a informação sobre o analito e seus possíveis perfis e interferentes desconhecidos [126].

Conseguiu-se construir um modelo para quantificar óleo essencial de romero, com concentrações conhecidas de óleo essencial e álcool como solvente. Este modelo foi robusto e o MCR-ALS mostrou-se como uma ferramenta poderosa para a quantificação de amostras complexas [124].

O uso do MCR-ALS aplicado ao tratamento de dados obtidos por GC×GC-FID está começando a se desenvolver e poucos trabalhos foram reportados na literatura.



# Capítulo 4:

# MATERIAIS E MÉTODOS



## **4. Materiais e métodos**

### **4.1 Materias e reagentes**

Para as transesterificações foi usado metanol grau HPLC (Tedia Brasil Company, 99,9 %). O hidróxido de sódio (NaOH) de pureza 99 % proveio da Labsynth. Os óleos vegetais obtidos no comércio local de Campinas-SP foram os seguintes: óleo de soja Liza, (Rio Verde-GO) o qual foi armazenado para envelhecer durante 7 meses; óleo de soja Soya, (Itumbiara-GO); óleo de soja Liza, (Rio Verde-GO) o qual utilizou-se com alimentos em uma temperatura aproximada de 250 °C e foi recuperado por filtração para ser empregado nas reações de transesterificação; óleo de soja sem processamento (fornecido pelo IQ-UNICAMP); óleo de girassol Liza (Mairinque-SP); óleo de girassol Mazzola (Mairinque-São Paulo); óleo de milho Liza (Mairinque-SP), óleo de canola Purilev (Mairinque-São Paulo), óleo de canola Salada (Santa Catarina-SC) e como gordura animal foi utilizado o sebo bovino providenciado pelo IQ-UNICAMP.

### **4.2 Preparação de biodiesel:**

#### **4.2.1 Preparo convencional (em lote):**

O equipamento convencional utilizado na preparação de biodiesel foi constituído por um condensador, um balão de fundo redondo, um agitador magnético, um banho termostaticado e uma chapa de aquecimento. As condições de trabalho empregadas neste sistema foram relação metanol/óleo: 6:1; temperatura: 60°C catalisador: hidróxido de sódio; concentração de catalisador: 1 % m/m, tempo de reação: 1 h e 30 min [42],[82]. Sob agitação.

O biodiesel foi preparado tomando-se 20 mL de óleo de soja em um balão de fundo redondo. Pesou-se 120 mL de metanol (93 g) para manter a relação metanol/óleo 6:1; da mesma forma pesou-se 0,93 g de NaOH (1 % de catalisador na mistura) o qual foi adicionado aos 120 mL de metanol e misturado. O óleo de soja foi aquecido até 60 °C; após alcançar esta temperatura adicionou-se os 120 mL da mistura metanol/NaOH, aquecendo-se durante 1 h e 30 min. Ao fim da reação foram observadas duas fases no balão, constituídas de uma emulsão de biodiesel/glicerol. Para a separação das duas

fases, foi necessário esperar no mínimo 12 h, sendo o biodiesel recolhido com o auxílio de um funil de separação [42].

#### ***4.2.1.1 Purificação do biodiesel***

Uma vez separadas as duas fases (biodiesel/glicerol) a fase inferior (biodiesel) foi lavada com uma solução salina de 10 %, removendo-se os ácidos graxos livres e o excesso de catalisador mediante a formação de sabão. A lavagem foi feita até a observação de água livre de sabão (transparente) [51].

#### ***4.2.1.2 Secagem do biodiesel***

No biodiesel já purificado, colocou-se sulfato de sódio anidro para retirar parte da água proveniente da purificação e da própria reação de transesterificação [42],[51].

### **4.2.2 Preparação do biodiesel assistida por ultrassom**

Para preparar o biodiesel por esse método utilizou-se um banho com ultrassom e controlador de temperatura. A mistura óleo/metanol foi colocada em um frasco pequeno com tampa [57],[58]. As condições de trabalho utilizadas foram: temperatura: 60 °C; relação metanol/óleo: 6:1; tempo de reação: até dissolução homogênea da mistura; catalisador: hidróxido de sódio (NaOH) e 1 % m/m. Adicionou-se 5 mL de óleo de soja em um recipiente pequeno de 40 mL, pesaram-se 30 mL de metanol (23,25 g) ao qual foram adicionados 0,2325 g de NaOH (1 % m/m de catalisador) para manter a relação metanol/óleo 6:1. A solução foi adicionada diretamente ao óleo e procedeu-se a preparação.

#### ***4.2.2.1 Purificação do biodiesel***

Foi colocado no recipiente onde estava a mistura de biodiesel água salina aos 10 % m/m. O sabão formado foi retirado com ajuda de uma seringa. Este processo de purificação foi repetido até se observar a água limpa e transparente [42],[51].

### 4.2.2.2 Secagem do biodiesel

O biodiesel já purificado foi transferido a outro recipiente, onde foi colocado sulfato de sódio anidro para retirar a água formada durante o processo de transesterificação e de lavagem [42].

## 4.3 Colunas Cromatográficas e Programação de Temperatura.

Os conjuntos de colunas empregados e as dimensões de cada coluna estão listados na Tabela 2. Cada coluna da primeira dimensão foi conectada à segunda por um conector *press fit*.

**Tabela 2. Conjuntos de colunas empregados para análises por GC×GC- FID e -qMS**

Conjunto	<sup>1</sup> D	<sup>2</sup> D
1	5 % fenil-95 % dimetilsiloxano; HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	Polietilenoglicol SPWax (1 m × 0,1 mm × 0,1 μm)
2	5 % fenil-95 % dimetilsiloxano HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	50% fenil-50 % dimetilsiloxano HP-50 (1 m × 0,1 mm × 0,1 μm)
3	5 % fenil-95 % dimetilsiloxano HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	Líquido iônico SLB-IL61 (1 m x 0,1 mm x 0,08 μm)

O conjunto 1 foi utilizado no GC×GC-FID e GC×GC-qMS, a programação de temperatura foi: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até isoterma de 240 °C permanecendo nesta temperatura por 16 min. A vazão foi 0,6 mL min<sup>-1</sup>. O injetor e detector operaram a 250 °C.

Os conjuntos 2 e 3 utilizaram a seguinte programação: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 275 °C, tempo da corrida 32 min e vazão de 0,7 mL min<sup>-1</sup>. O injetor e detector operaram a 250 °C e 275 °C, respectivamente.

## 4.4 Parâmetros operacionais no GC×GC-FID

O equipamento GC×GC-FID empregado neste trabalho foi um cromatógrafo a gás HP 6890 (Wilmington, DE, EUA) com detector FID, equipado com injetor do tipo split-splitless. O modulador criogênico utilizava o N<sub>2(l)</sub> para os jatos frios e o N<sub>2(g)</sub> aquecido a 350 °C para os jatos quentes durante a modulação, estes foram controlados por duas



válvulas solenoides de três vias (Ascoval Ind. e Com. Ltda, Brasil). O controle do sistema GC×GC foi baseado na plataforma LabVIEW® versão 8.5 e foi utilizado o conversor AD/DA NI USB de 12 bits da National Instruments(Austin, TX, EUA). A percentagem gás quente na focagem e de gás frio na coleta foram de 50 % frio, 60 % gás quente. O período de modulação foi de 6s e a taxa de aquisição foi 100 Hz.

## **4.5 Parâmetros operacionais no GC×GC-qMS**

O equipamento GC×GC-qMS empregado foi um equipamento comercial de GC-qMs modelo QP2010 Plus (Shimadzu, Tokyo, Japão) com injetor do tipo split-splitless. O gás de arraste utilizado foi H<sub>2</sub> (grau 6.0) a uma vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram 270 °C e 250 °C respectivamente. A temperatura da fonte de íons foi de 230 °C. A voltagem da multiplicadora de elétrons foi 0,75 kV. O modulador trabalhou com modulação criogênica, o N<sub>2(l)</sub> foi utilizado para os jatos frios e o N<sub>2(g)</sub>, aquecido a 350 °C para os jatos quentes. Durante a modulação. Estes foram controlados por duas válvulas solenoides de três vias (Ascoval Ind. e Com. Ltda, Brasil). O controle do sistema GC×GC foi baseado na plataforma LabVIEW® versão 8.5 e foi utilizado o conversor AD/DA NI USB de 12 bits da National Instruments(Austin, TX, EUA). A percentagem de quente na focagem e frio na coleta foram de 50 % frio, 60 % gás quente. O período de modulação foi de 6 s e a taxa de aquisição foi 25 Hz com um intervalo de varredura de massas de 40-350 m/z.

### **4.5.1 Identificação dos analitos**

A identificação dos ésteres metílicos no biodiesel foi realizadas por GC×GC-qMS por meio da comparação entre seus respectivos espectros de massas com os espectros presentes no banco de dados do laboratório, utilizando o programa GCImage (Zoex Corporation, Houston, USA). Foram considerados somente os picos em que a similaridade entre os espectros foi maior que 80 %. Para a obtenção dos índices de retenção, foi injetado um padrão de alcanos com uma concentração de 100 ppm de C7-C30 saturados. Para facilitar a identificação de FAME também foi utilizada como

ferramenta a tabela de índices de retenção compilado pelo laboratório, compostos que não lograram identificar-se pelo programa foram identificados graças à estruturação dos cromatogramas.

## **4.6 Aquisição e interpretação de dados**

O software comercial utilizado para a aquisição de dados e para o controle do equipamento GC foi a Chemstation (Agilent, Wilmington, EUA). Os dados do espectrômetro de massas foram analisados pelo software comercial GCMSsolution versão 5.3 (Shimadzu, Kyoto, Japão) e as aquisições dos GC×GC-FID e -qMS foram tratadas pelo software comercial GCImage versão 2.0 (Zoex Corporation, Houston, USA). Este software é responsável por remodelar os cromatogramas brutos para sua visualização na forma de diagramas de contorno e os parâmetros qualitativos (por exemplo, processamento de espectros de massas, ajuste de linha base e métodos de alisamento de picos).

## **4.7 Análise multivariada**

Os cromatogramas bidimensionais foram convertidos em arquivos ASCII e tratados utilizando software MatLab 7.8 (Mathworks, Natick, MA, USA) e rotinas de MPCA e MCR-ALS. Essas foram obtidas usando o PLS-Toolbox 3.6 (Eigenvector Research, Wenatchee – WA, USA) e a rotina para MCR disponível em (<http://www.cid.csic.es/homes/rtaqam/>) [127]. Para ambas análises, foi realizado o alinhamento dos cromatogramas nos eixos de tempo, nas duas dimensões, utilizando-se um algoritmo criado no grupo de pesquisa dirigido pelo Prof. Dr. Ronei J. Poppi (Laboratório de Quimiometria em Química Analítica, LAQQA/ IQ-UNICAMP).

### **4.7.1 Análise exploratória (MPCA)**

Para a verificação de possíveis padrões de agrupamentos, foi realizado, para cada modelo, o pré-processamento de autoescalamamento, a fim de dar a mesma importância a todos os picos cromatográficos. Assim, foram analisados os gráficos de escores e pesos e das componentes principais responsáveis pelos agrupamentos. Os modelos foram avaliados mediante a eliminação de valores atípicos (*outliers*) e a seleção

apropriada das componentes principais. Em alguns casos, para melhor observação dos compostos minoritários, foram retirados os picos mais intensos dos cromatogramas.

#### 4.8 Variação das condições de preparo de biodiesel de soja

Com o método de preparo miniaturizado de biodiesel por ultrassom, foram testados os diferentes tratamentos para o preparo do mesmo, observando-se se os diferentes tratamentos afetariam de maneira significativa ou não a produção de biodiesel, variando as condições de trabalho segundo a literatura[57],[58].

**Tabela 3. Condições de reação variadas no modo de preparo de biodiesel**

<b>Tempo de reação</b>	60 min	30 min	
<b>Concentração de catalisador</b>	0,5 % m/m	0,75 % m/m	1 % m/m
<b>Temperatura de reação</b>	32 °C	40 °C	60 °C
<b>Relação metanol/óleo</b>	6:1	7,5:1	

Uma vez preparados os biodieseis por diferentes tratamentos, estes foram avaliados por MPCA para procurar padrões de agrupamento entre eles, com a finalidade de encontrar alguma diferença entre os ésteres metílicos formados pelas distintas condições de trabalho.

#### 4.9 Avaliação da combinação de diferentes conjuntos de colunas de polaridades e espessuras diferentes

Após as condições de preparo para o biodiesel serem otimizadas foram escolhidas as melhores condições de separação no GC×GC-FID (temperatura do forno, injetor, detector, período de modulação, vazão de gás de resfriamento e aquecimento). Foram testados três diferentes conjuntos de colunas. A matéria prima escolhida para esta avaliação foi o óleo de soja novo e um óleo de soja com 7 meses de envelhecimento. Os dados obtidos foram tratados quimiometricamente por meio do MPCA. Os escores foram utilizados para procurar padrões de agrupamento entre as duas amostras (biodiesel de óleo de soja novo, biodiesel de óleo de soja envelhecido) e a visualização dos pesos foi fornecida para observar diferenças significativas entre os biodieseis e as regiões do cromatograma responsáveis por isso, de modo a escolher o conjunto de

colunas que fornecesse uma boa separação dos compostos, a fim de utilizar o melhor conjunto para separar biodieseis de diferentes matérias primas.

#### **4.10 Avaliações de biodieseis de quatro diferentes tipos de óleo mais sebo bovino como matérias primas**

Uma vez escolhida a melhor combinação de colunas, foram preparados biodieseis metílicos de soja com diferentes marcas de óleo e tempos de envelhecimento diferentes, assim como também de soja não processada, soja recuperada após do uso doméstico, canola, girassol, milho e sebo bovino. Os biodieseis foram injetados no GC×GC-FID e seus dados foram tratados por ferramentas quimiométricas por meio do MPCA. Os escores foram utilizados para verificação de possíveis padrões de agrupamento e os pesos para determinar quais picos eram responsáveis pela separação.

#### **4.11 Quantificação de misturas BXX por o método de resolução de curvas (MCR-ALS)**

O MCR-ALS foi utilizado na quantificação de biodiesel em diesel através de GC×GC-FID, foram utilizados três tipos de diesel mineral variando a sua concentração de enxofre as quais foram S50, S500 e S1800, respectivamente. Para isto, construiu-se curvas de calibração com cada tipo de diesel mineral e biodiesel de óleo de soja novo com concentrações 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 % v/v. Utilizaram-se cinco amostras de validação com concentrações de biodiesel de óleo de soja, óleo de milho, óleo de girassol e suas respectivas misturas, além disso construiu-se uma curva para óleo de canola com concentrações de 3,0; 5,0; 10,0; 20,0 % v/v. Para a construção dos modelos, os cromatogramas foram desdobrados e as regiões referentes ao solvente não foram utilizados para nenhuma análise, pois apresentaram alargamento excessivo na segunda coluna, da mesma maneira os compostos identificados no gráfico de pesos de matérias primas que eram diferentes não foram utilizados para validar a curva obtida para a quantificação de misturas BXX, para assim obter um algoritmo adequado para misturas de qualquer matéria prima. O MCR-ALS foi utilizado com as restrições de não negatividade para concentração e, como estimativas iniciais, foram utilizados os cromatogramas puros de biodiesel e diesel mineral respectivamente.



Capítulo 5:  
RESULTADOS E  
DISCUSSÃO



## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Modo de preparo de biodiesel

O biodiesel feito por agitação mecânica após a sua purificação e secagem foi diluído em iso-octano (0,100 g de biodiesel/1 mL de Iso-octano) e com uma concentração de 10 % m/m foi injetado no GC×GC-FID.

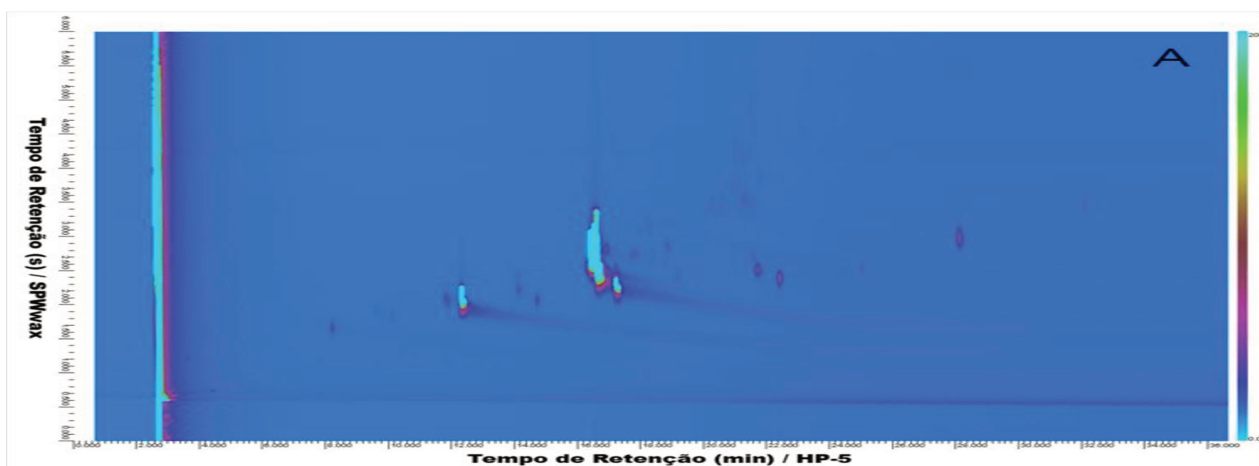


Figura 12. Cromatograma de biodiesel de soja feito com a técnica de preparo convencional em lote adquirido no sistema GC×GC-FID. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma por 16min; Período de modulação de 6 s; vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição: 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 °C; conjunto de colunas 1; volume de injeção 1 µL.

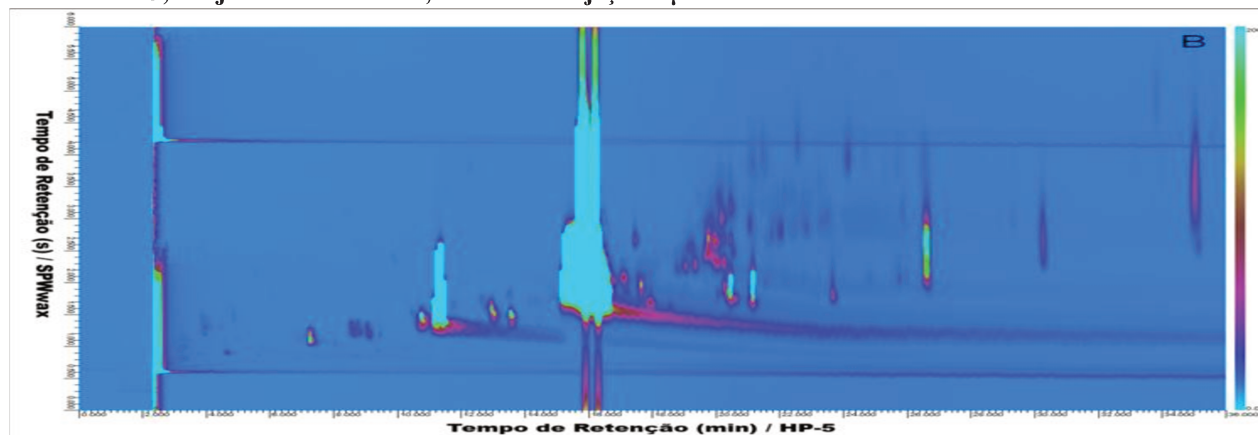


Figura 13. Cromatograma de biodiesel de soja assistido com ultrassom adquirido no sistema GC×GC-FID. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma por 16 min; período de modulação de 6 s; vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 100 Hz temperatura do injetor e detector 250 °C; conjunto de colunas 1; volume de injeção 1 µL.

Como é observado nas figuras 12 e 13 os ésteres metílicos de ácidos graxos formados baixo assistência do ultrassom e com pela técnica convencional em lote têm aspectos bastante similares [58]. A grande vantagem do ultrassom é o aumento na produção de biodiesel em menor tempo de reação. Este efeito é atribuído ao crescimento e formação de bolhas conhecido como cavitação ultrassônica induzida na



fase líquida, que acelera a transferência de massa e a área de contato entre o óleo e o catalisador [57], aumentando, portanto, a produção dos ésteres metílicos. Este método de preparo é ideal para a realização da análise quimiométrica, já que permite a preparação de um número grande de biodieseis no menor tempo possível e, portanto, foi o escolhido para as análises posteriores.

### 5.1.1 Condições de preparo do biodiesel

As condições de trabalho foram testadas e preparou-se uma amostra, e sua replicata com cada condição de trabalho. Para explicar a variância na análise exploratória, foram escolhidas 2 componentes principais que forneciam uma explicação total de 98 % variância. A tabela 4 mostra as denotações para cada tratamento realizado no biodiesel.

Tabela 4. Diferentes tratamentos para o preparo de biodiesel de soja.

Processo	Tempo de reação (min)	Concentração do catalisador (% m/m)	Relação molar óleo/metanol	Temperatura de reação (°C)
A	60	0,75	1:6	32
B	30	1	1:6	32
C	60	1	1:6	60
D	60	1	1:6	40
E	60	1	1:7,5	32
F	60	0,5	1:6	32
G	30	0,5	1:6	32

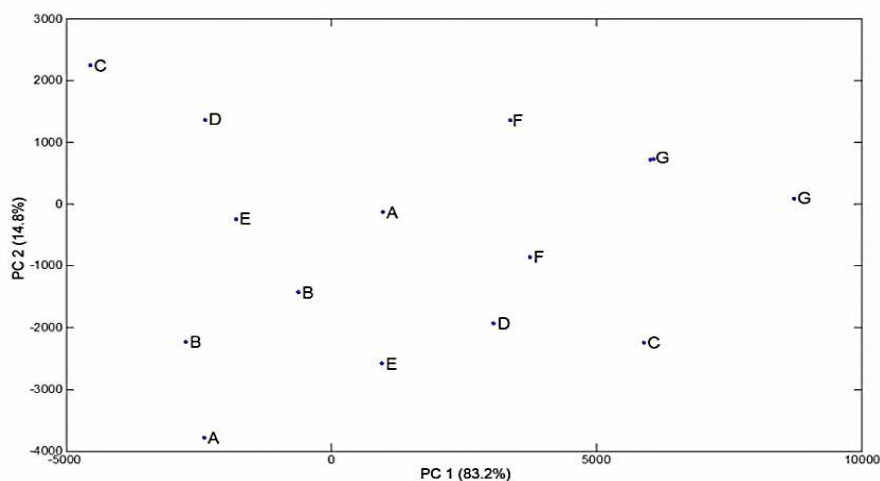


Figura 14. Representação gráfica dos PC para diferenciação dos diversos tratamentos no preparo de biodiesel de soja por MPCA.

O gráfico de escores na figura 14 mostra um espalhamento interamostral similar entre replicatas e amostras feitas com tratamentos diferentes, portanto, qualquer tratamento pode ser utilizado na hora de preparar os biodieseis já que não obtem-se diferença significativa entre os ésteres metílicos de ácidos graxos produzidos diferentes formas de preparo, assim foi escolhido o mais recomendado pela literatura, em que foram obtidos maior rendimento dos ésteres metílicos.

As condições de trabalho elegidas ao transcurso do trabalho foram: temperatura: 32 °C, razão metanol/óleo: 6:1, tempo de reação: 30min, concentração de catalisador: 0,5 % m/m e assistida por ultrassom [42],[57],[58].

## **5.2 Identificação dos ésteres metílicos minoritários em biodieseis de diversas fontes e matérias primas**

Com um intervalo de varredura de massas de 40-350 m/z e 25 Hz, a identificação dos compostos por GC×GC-qMS mais leves como C11-C22 foram identificados por similaridade espectral variando entre 80 e 98 %, já para os ésteres metílicos mais pesados e alguns insaturados, os espectros de massas permitiram apenas identificar o grupo funcional, indicando se o composto seria hidrocarboneto, álcool ou éster metílico. Porém, para tais compostos, o uso da estruturação cromatográfica e índice de retenção permitiram sua identificação. Foi aproveitado também, o banco de dados fornecido no grupo de pesquisa, com o qual foram feitas comparações segundo os índices de retenção dos compostos e estruturação, ferramenta de grande utilidade em GC×GC.

A alta capacidade de separação e detectabilidade do sistema GC×GC para identificar os compostos minoritários dos biodieseis de diversas fontes foi utilizada. Para melhor observação dos mesmos, foram retiradas as famílias de compostos C18 e C16, que são os maioritários em todos os biodieseis e que possuem um alargamento na segunda dimensão considerável. Para evitar a saturação do detector nesta faixa, o mesmo foi desligado, portanto esta família de compostos não foi identificada tomando-se em conta somente os compostos de mais baixa concentração.

Os principais componentes detectados nos biodieseis foram C14:0, C17:0, 12-C17:1, C20:1n-6, C20:2n-6, C22:0, C23:0 e C24:0 [70], devido ao incremento em detectabilidade e sensibilidade, um maior número de FAME insaturados foram detectados como C15:1, C20:1n-6, C20:2n-6, C23:5.

Na figura 15 encontram-se os ésteres metílicos de ácidos graxos identificados nos biodieseis de óleo de soja nova, de óleo de soja envelhecida e óleo de soja recuperada são numerados e nomeados na Tabela 5 respectivamente.

Os principais constituintes identificados foram os C17, C20, C22, C23 e C24 [70], conseguindo detectar ésteres insaturados ainda em baixas concentrações. Compostos como C20:1n-6 e C17:1 foram identificados a partir da estruturação do cromatograma e dos tempos de retenção fornecidos na biblioteca de dados do grupo de pesquisa.

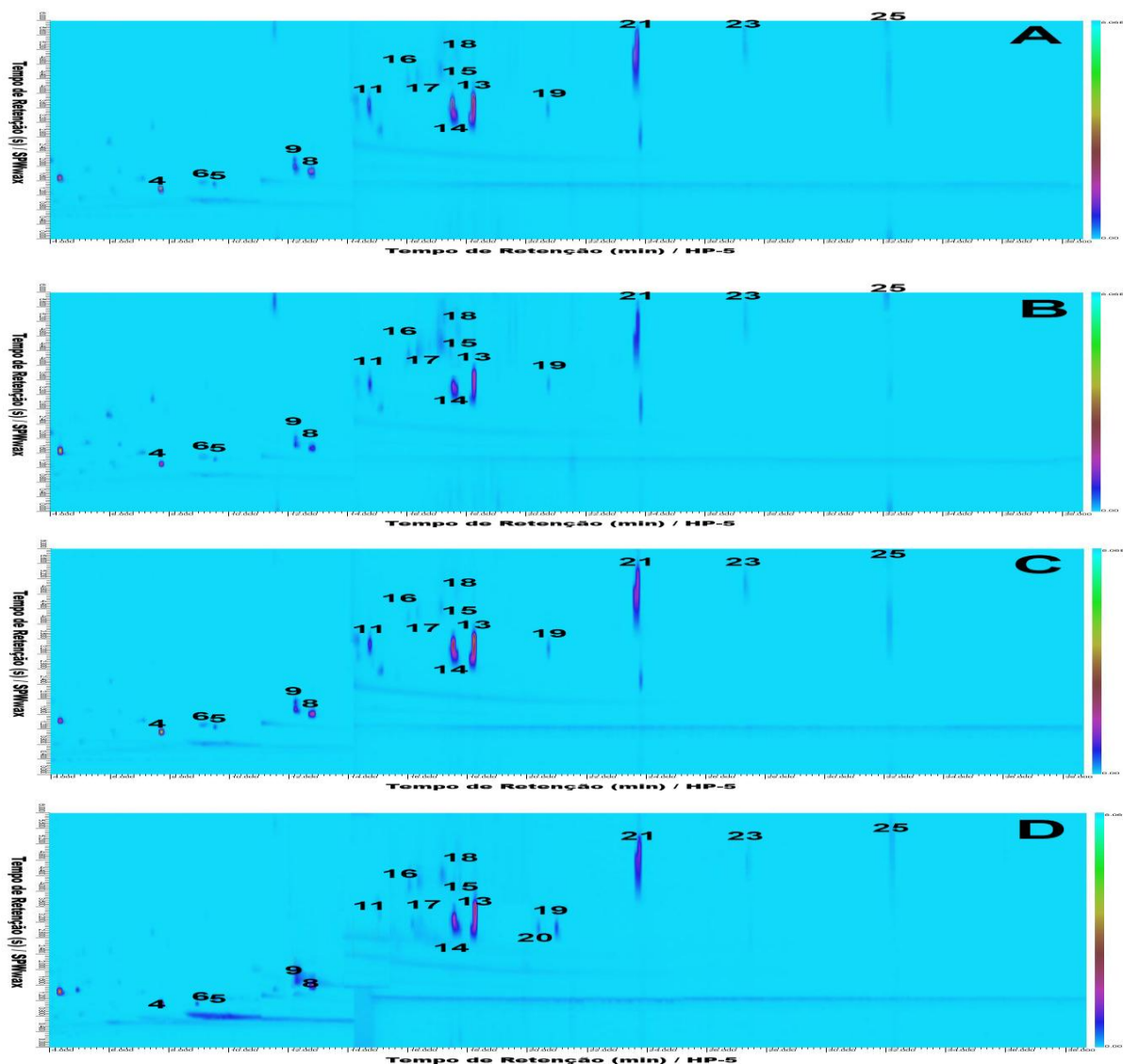


Figura 15. Cromatogramas adquiridos no sistema GC×GC-qMS para amostras de A = óleo de soja novo, B = óleo de soja envelhecido, C = óleo de soja recuperado, D = óleo de soja não processado; com o conjunto de coluna 1. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> por 16min até isoterma a 240 °C, período de modulação de 6 s; vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 25 Hz temperatura do injetor e da linha de transferência:270, 250°C respetivamente, temperatura da fonte de íons: 230 °C; voltagem da multiplicadora de elétrons 0,75 kV, corte do solvente: 2 min; corte de família C16:10-11 min, corte de família, corte de família C18 14.5-15 min.

O segundo grupo de biodieseis analisados foram os biodieseis de óleo de canola, milho, girassol e sebo bovino. Os compostos identificados nestes biodieseis estão igualmente na tabela 5 e numerados nos cromatogramas correspondentes. Aqui foram identificados novos compostos pesados e insaturados. Tais como C22:1n-9 para biodiesel de óleo de milho e óleo de girassol e C23:1n-9, C24:1n-9 para biodiesel de óleo de canola.

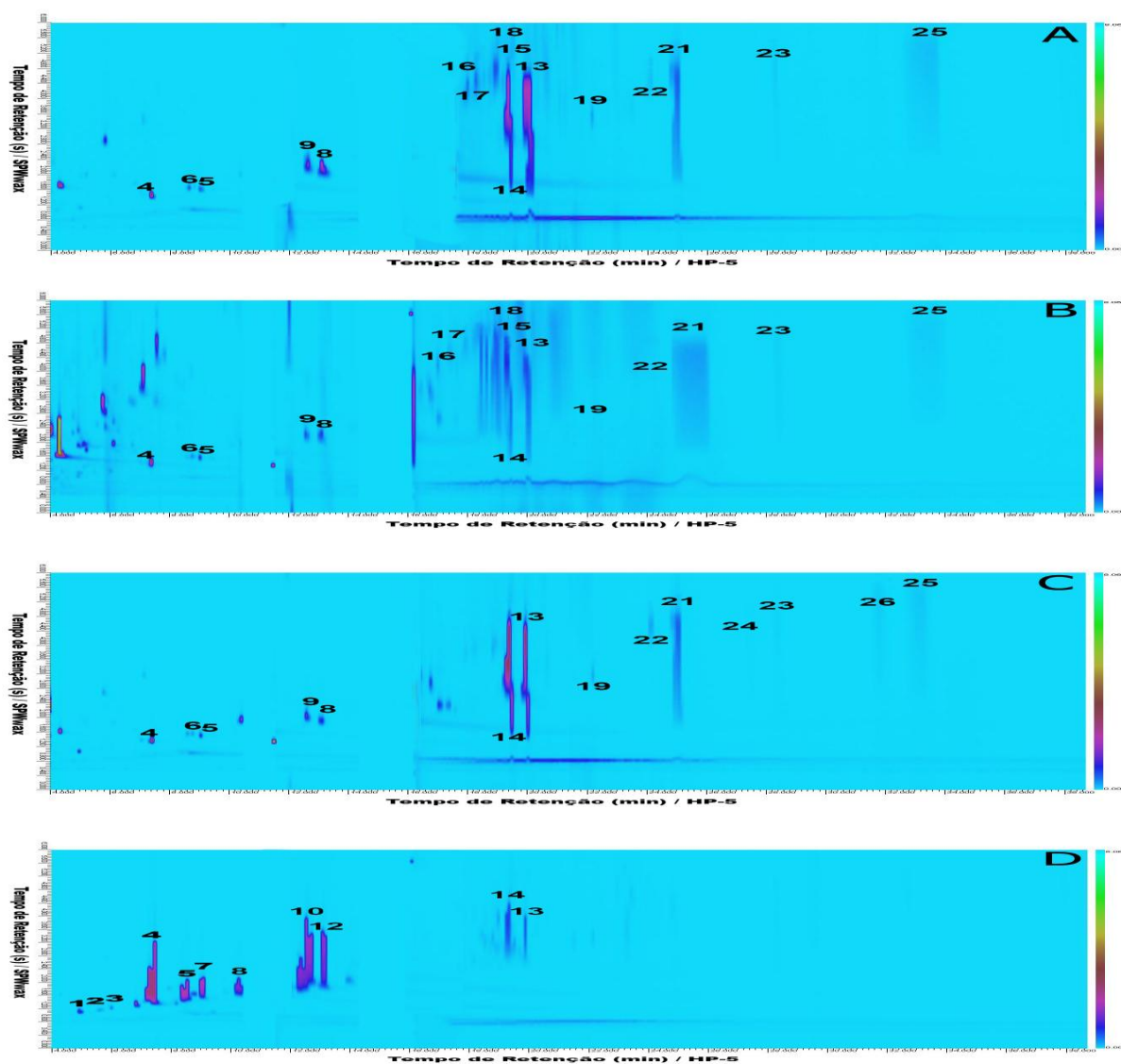


Figura 16. Cromatogramas adquiridos no sistema GC×GC-qMS para amostras de A = óleo de milho, B = óleo de girassol, C = óleo de canola, D = sebo bovino; com o conjunto de coluna 1. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> por 16 min até isoterma a 240 °C, período de modulação de 6 s; vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 25 Hz temperatura do injetor e da linha de transferência: 270, 250 °C respectivamente; temperatura da fonte de íons: 230 °C; voltagem da multiplicadora de elétrons 0,75 kV, corte do solvente: 2 min; corte de família C16: 10-11 min, corte de família, corte de família C18 14.5-15 min.

Ao longo das identificações, foi observada a baixa disponibilidade de espectros de massas e índices de retenção para identificação de espécies com comprimentos de cadeias ímpares saturadas e insaturadas.

**Tabela 5. Ésteres metílicos de ácidos graxos identificados por GCxGC-qMS em amostras de biodiesel de óleo de soja novo, óleo de soja envelhecido, óleo de soja recuperado, óleo de soja não refinado, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de canola e sebo bovino.**

N	Nome do composto	Símbolo	Formula	<sup>1</sup> t <sub>R</sub> /min	<sup>2</sup> t <sub>R</sub> /min	IR Exp	IR ref	SI	A	B	C	D	E	F	G	H
1	undecanoato de metila <sup>c</sup>	C11:0	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	5,2	0,8	1455	1421	839								x
2	dodecanoato de metila <sup>c</sup>	C12:0	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	7,1	0,95	1629	1633	890								x
3	tridecanoato de metila <sup>c</sup>	C13:0	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	7,8	1,00	1724	1720	880								x
4	tetradecanoato de metila <sup>c</sup>	C14:0	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	7,7	1,00	1735	1723	938	x	x	x	x	x	x	x	x
5	pentadecanoato de metila <sup>c</sup>	C15:0	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	13,0	1,4	1826	1824	806	x	x	x	x	x	x	x	x
6	pentadecenoato de metila <sup>a</sup>	C15:1n-3	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	9,3	1,52	1818	-	-	x	x	x	x	x	x	x	
7	hexadecanoato de metila <sup>c</sup>	C16:0	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	10,4	1,6	1892	1886	907								x
8	heptadecanoato de metila <sup>c</sup>	C17:0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	12,8	1,72	2027	2030	836	x	x	x	x	x	x	x	x
9	12-heptadecanoato de metila <sup>a</sup>	C17:1	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	12,2	1,80	2007	2003	-	x	x	x	x	x	x	x	
10	octadecanoato de metila <sup>c</sup>	C18:0	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	13,1	2,6	2008	2013	860								x
11	9,12-octadecenoato de metila <sup>a,b</sup>	C18:2n-6	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	14,7	3,48	2096	2092	-	x	x	x	x				
12	nonadecanoato de metila <sup>c</sup>	C19:0	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	13,9	2,4	2234	2235	900								x
13	eicosanoato de metila <sup>c</sup>	C20:0	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	16,2	3,2	2332	2332	837	x	x	x	x	x	x	x	x
14	14-eicosenoato de metila <sup>a</sup>	C20:1n-6	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	15,5	3,4	2308	2310	-	x	x	x	x	x	x	x	x
15	eicosapentaenoato de metila <sup>a</sup>	C20:3n-3	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	18,3	4,64	2286	-	-	x	x	x	x	x	x		
16	8,11,14-eicosatrienoato de metila <sup>a</sup>	C20:3n-6	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	16,4	4,45	2246	2274	-	x	x	x	x	x	x		
17	5,8,11,14-eicosatetraenoato de metila <sup>a</sup>	C20:4n-6	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	16,7	4,5	2258	2282	-	x	x	x	x	x	x		
18	5,8,11,14,17-eicosapentanoato de metila <sup>c</sup>	C20:5n-3	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	18,0	5,2	2301	2300	801	x	x	x	x	x	x		
19	heneicosanoato de metila <sup>a</sup>	C21:0	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	20,9	3,48	2428	2428	-	x	x	x	x	x	x	x	
20	heneicosenoato de metila <sup>a</sup>	C21:1n-6	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	20,5	2,8	2310	-	-				x				
21	docosanoato de metila <sup>c</sup>	C22:0	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	24,7	4,84	2505	2530	920	x	x	x	x	x	x	x	
22	13-docosenoato de metila <sup>c</sup>	C22:1n-9	C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	23,9	4,52	2500	2507	881					x	x	x	
23	tricosanoato de metila <sup>c</sup>	C23:0	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	28,1	5,1	2634	2628	900	x	x	x	x	x	x	x	
24	tricosenoato de metila <sup>c</sup>	C23:1n-9	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	27,8	5,3	2460	2458	800					x	x	x	
25	tetracosanoato de metila <sup>c</sup>	C24:0	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	32,5	5,6	2730	2731	854	x	x	x	x	x	x	x	
26	tetracosenoato de metila <sup>c</sup>	C24:1n-9	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	32,0	5,8	2694	2700	804								x

A= óleo de soja novo, B= óleo de soja envelhecido, C= óleo de soja recuperado, D= óleo de soja não processado, E=óleo de milho, F=óleo de girassol, G=óleo de canola, H= Sebo bovino. <sup>1</sup>t<sub>R</sub>/min= tempo de retenção na primeira dimensão, <sup>2</sup>t<sub>R</sub>/min= tempo de retenção na segunda dimensão, IR Exp= Índice de retenção experimental, IR ref= Índice de retenção na segunda dimensão, SI= similaridade com a biblioteca NIST 2008. a= identificado por avaliação visual da estruturação cromatográfica, b= identificação com padrões, c= biblioteca

### 5.3 Avaliação da combinação de diferentes conjuntos de colunas de polaridades e espessuras diferentes

Prepararam-se três amostras de biodiesel com óleo de soja novo e com óleo de soja envelhecido. Cada amostra foi realizada com uma replicata resultando em um total de 6 amostras para cada biodiesel. Estas foram injetadas no GC×GC-FID, resultando nos perfis cromatográficos mostrado nas figuras 17, 18 e 19.

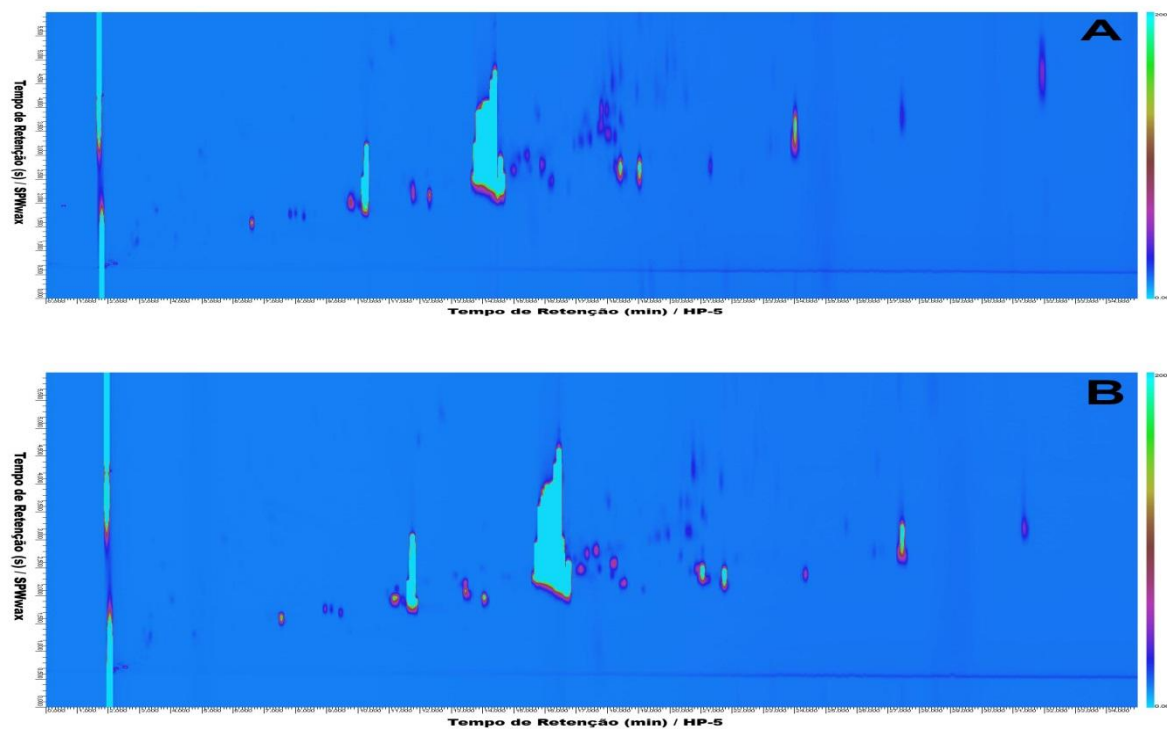
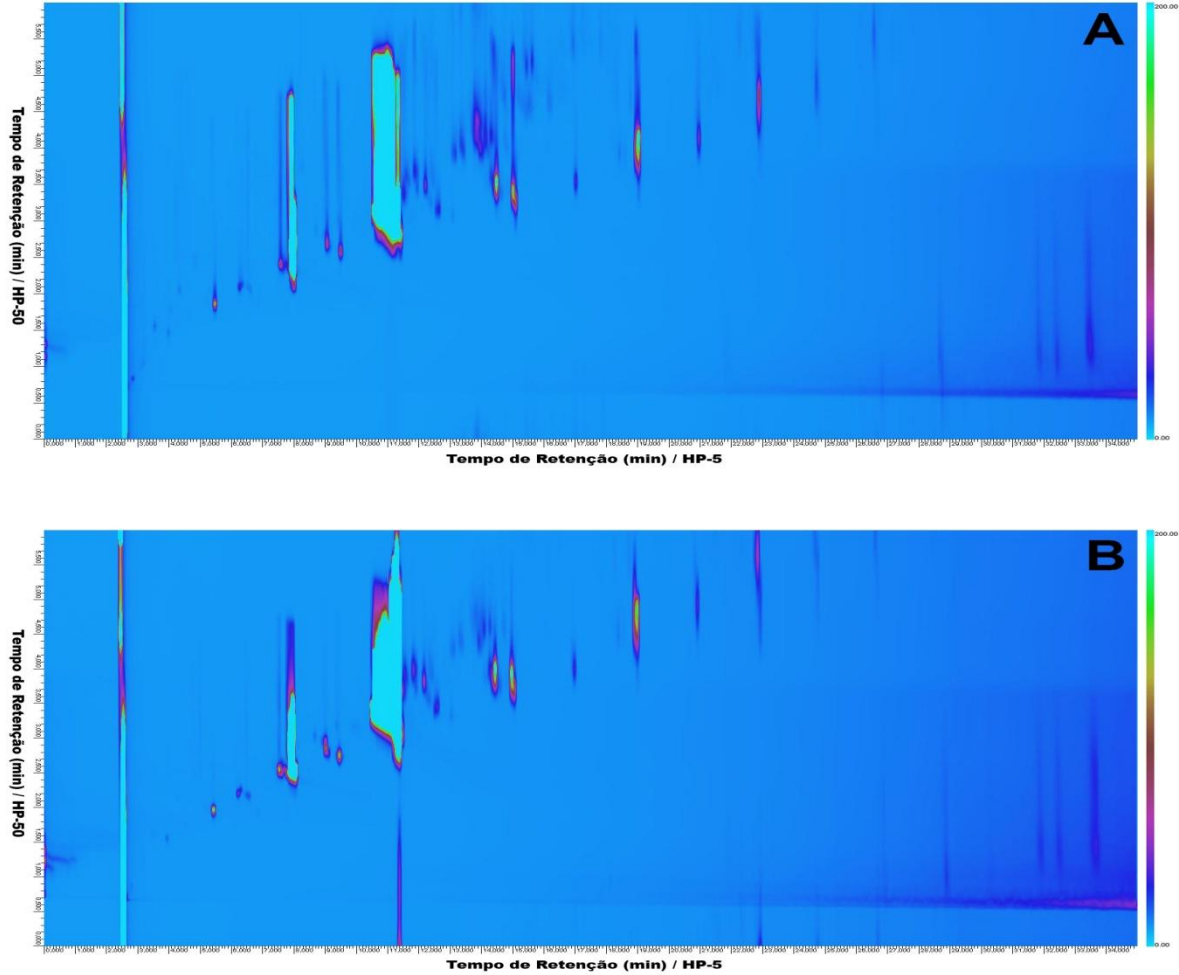
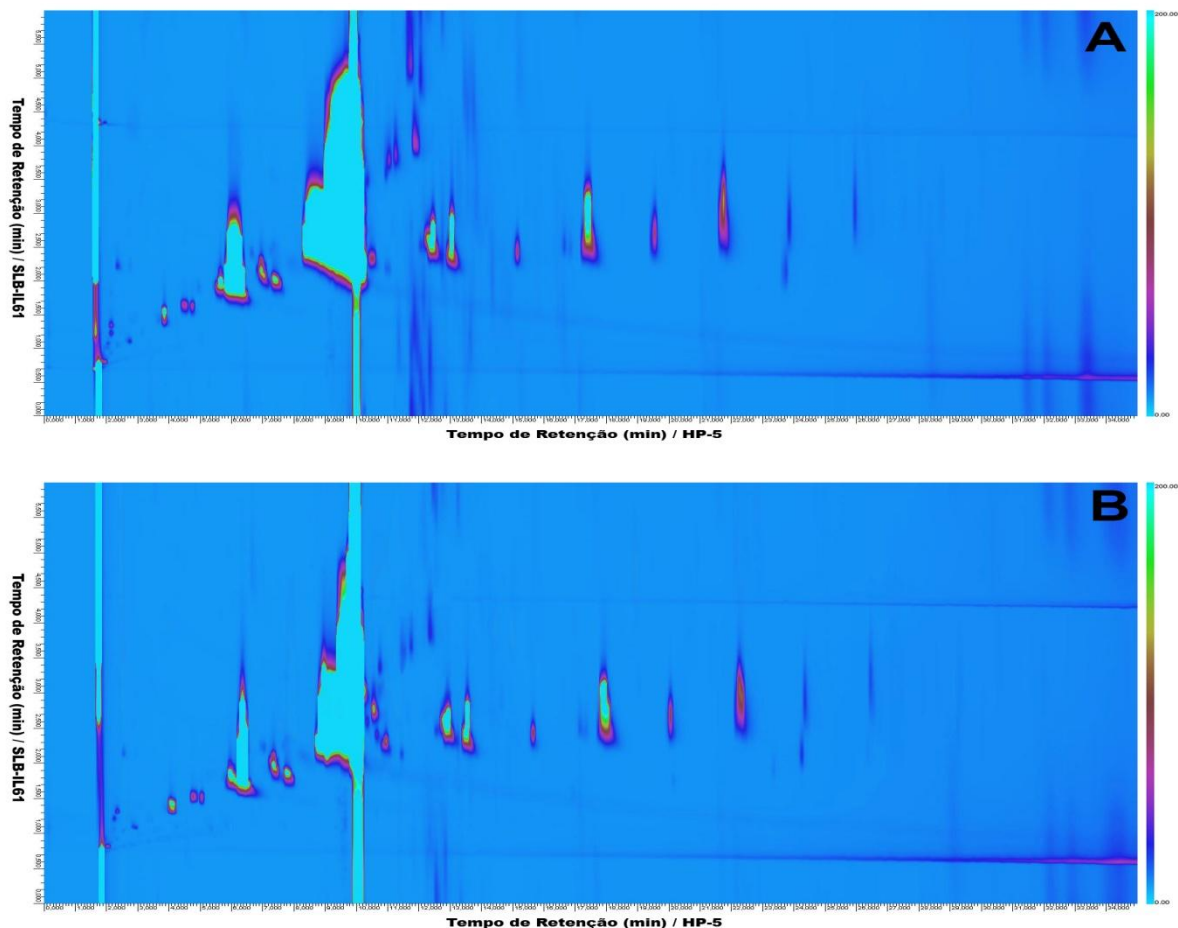


Figura 17. Cromatogramas de biodieseis de óleo de soja, A= envelhecido, B = novo adquiridos no sistema GC×GC-FID com um conjunto de coluna 1. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma por 16 min; período de modulação: 6 s; vazão, 0,6 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição: 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 °C.



**Figura 18.** Cromatogramas de biodieseis de óleo de soja, A= envelhecido, B = novo adquiridos no sistema GC×GC-FID com um conjunto de coluna 2. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma por 16 min; período de modulação: 6 s; vazão, 0,6 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição: 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 °C.



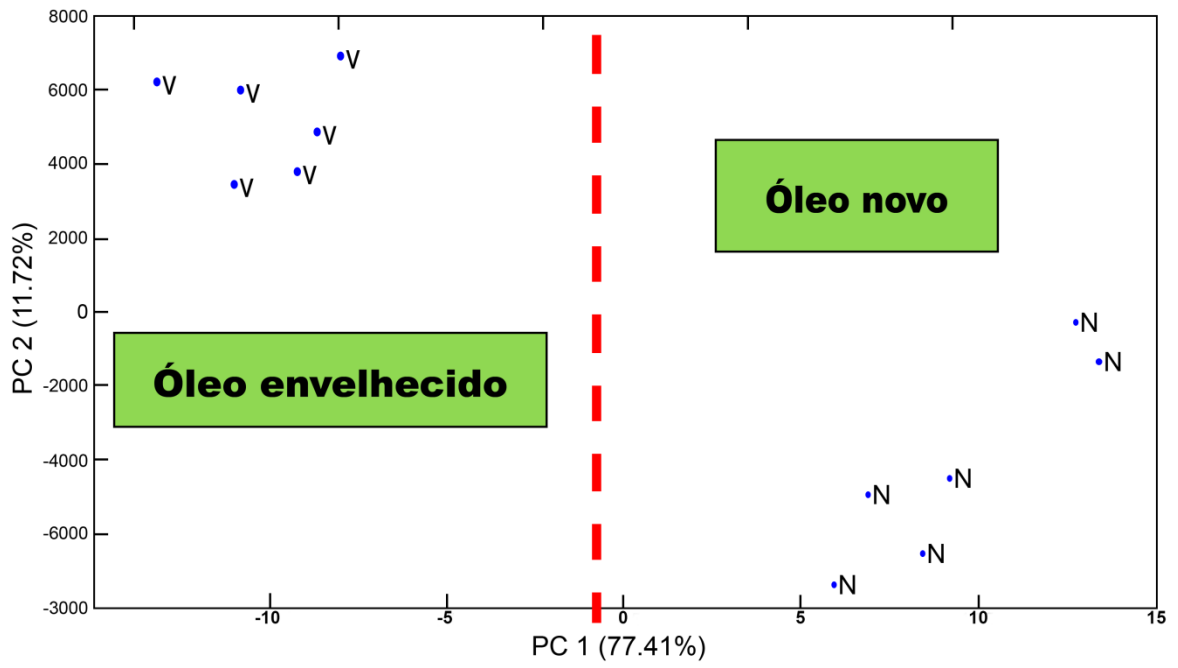


**Figura 19.** Cromatogramas de biodieseis de óleo de soja, A= envelhecido, B = novo adquiridos no sistema GC×GC-FID com um conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma por 16 min; período de modulação: 6 s; vazão, 0,6 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição: 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 °C.

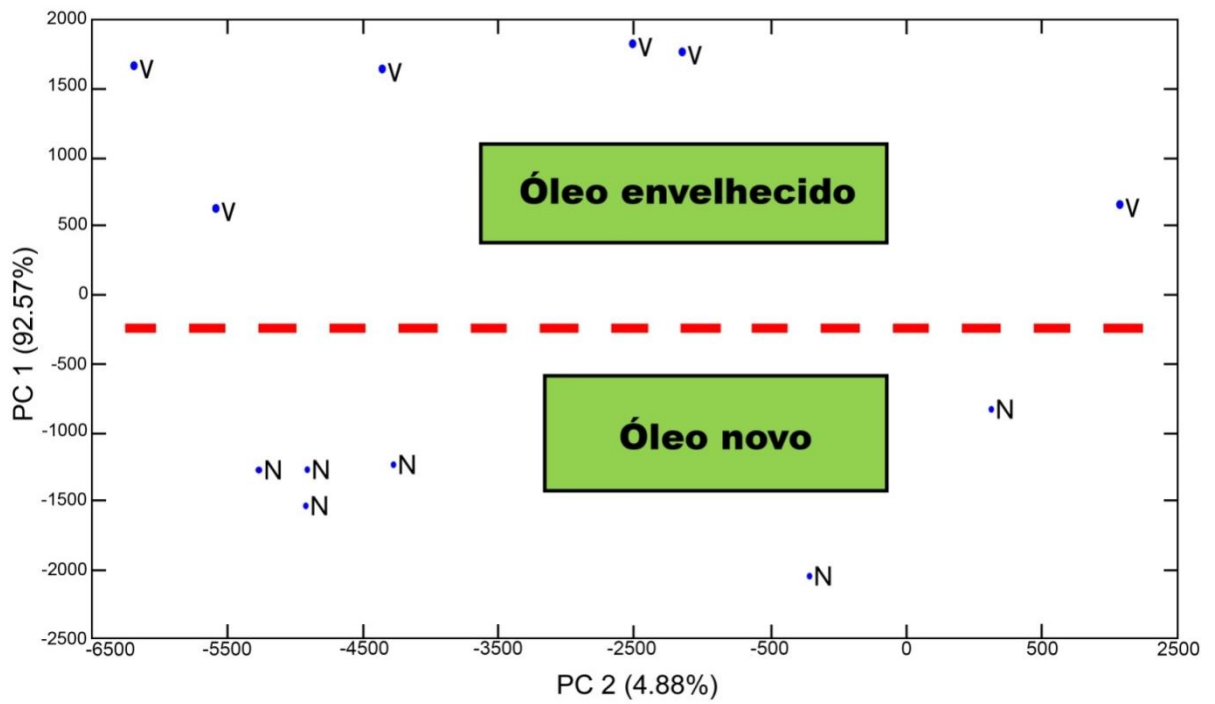
O número de componentes principais escolhidas para realizar a análise exploratória variaram dependendo do conjunto de coluna. Para o conjunto de coluna 1, utilizou-se 3 componentes, que explicavam uma variância de 94,66 %, para o conjunto 2 escolheu-se duas componentes explicando 97,45 % da variância, por último para o conjunto 3 escolheu-se 3 componentes ou autovetores que explicavam o 98 %.

Os gráficos de escores são mostrados na figura 20.

(A)



(B)



(C)

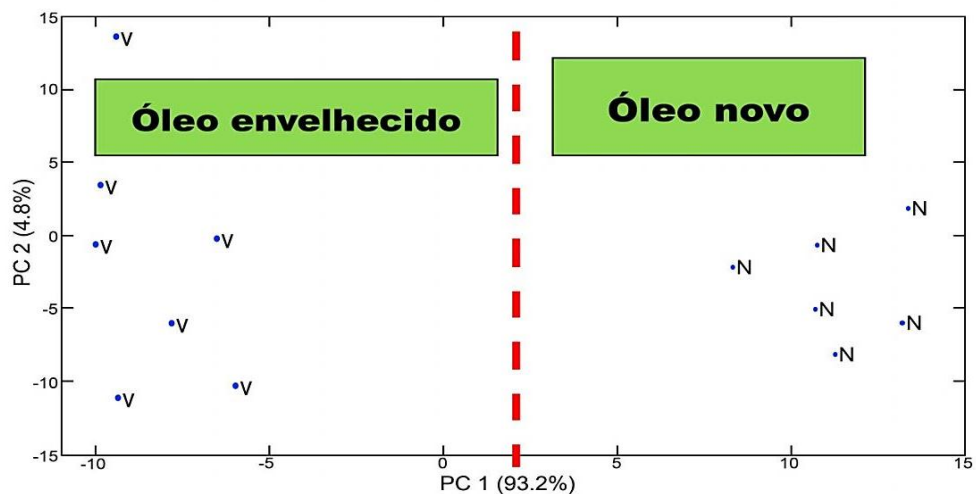


Figura 20. Representação gráfica dos PC para diferenciação de biodiesel de soja feita com óleo envelhecido e óleo novo por MPCA, para os três conjuntos de colunas. (A) Conjunto 1, (B) Conjunto 2, (C) Conjunto 3.

Para determinar se o modelo estava ajustado adequadamente foi gerado o gráfico de resíduos Q versus  $T^2$  Hotelling para cada coluna.

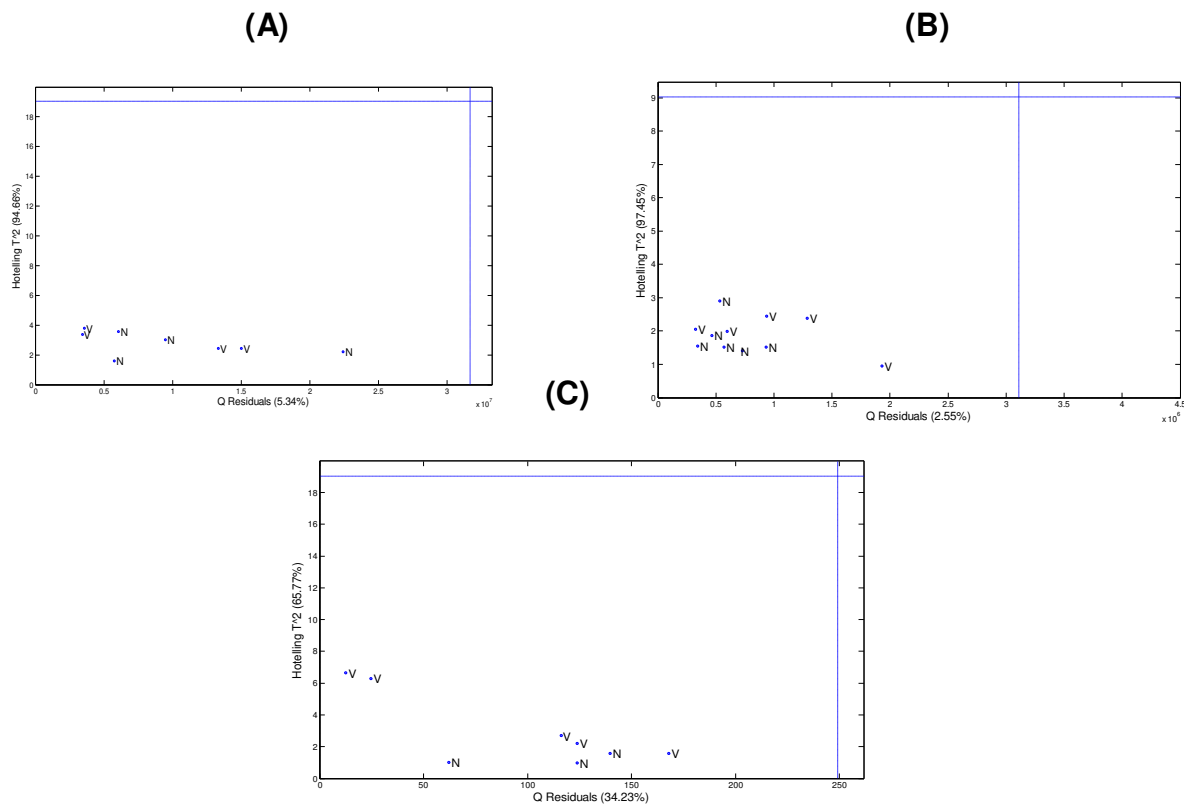
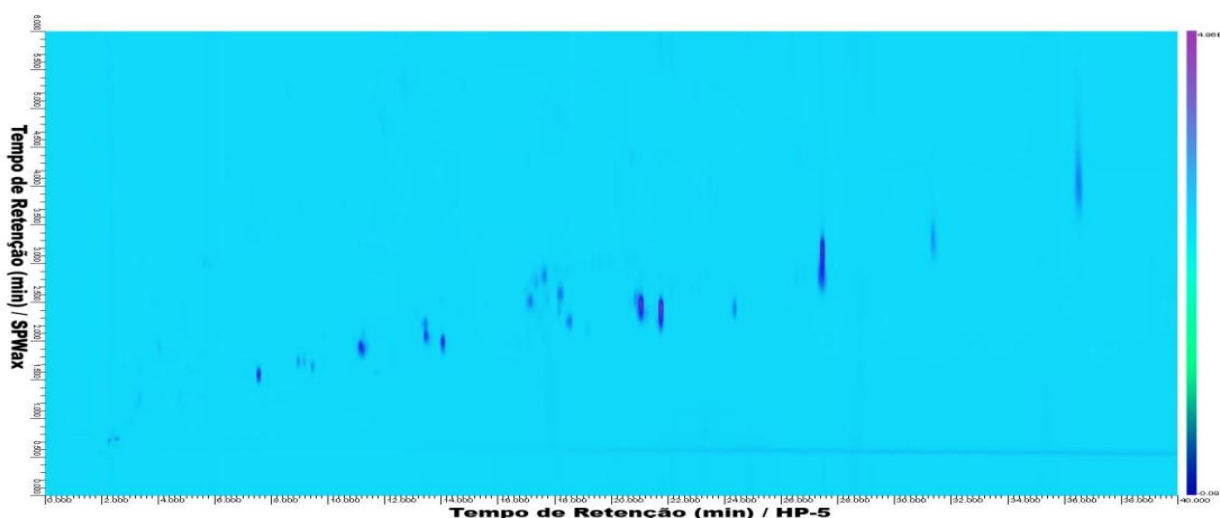


Figura 21. Gráfico de Q resíduos versus  $T^2$  de Hotelling para as amostras de biodiesel de soja feitos com óleo de soja envelhecido e novo para os três conjuntos de colunas (A) Conjunto 1, (B) Conjunto 2, (C) Conjunto 3.

Após a conclusão de que o modelo estava ajustado, pois não havia nenhuma amostra *outlier* (fora dos limites estabelecidos), com uma rotina no MPCA criado no grupo de pesquisa, foram separados os pesos que aportam contribuições positivas das negativas, observando, portanto os compostos que são comuns em todos os biodieseis que contribuem à separação (contribuições positivas). Os compostos que diferem nos biodieseis contribuem igualmente à separação (contribuições negativas) assim foram fornecidos o gráfico de pesos nas figuras 22, 24 e 25.

(A)



(B)

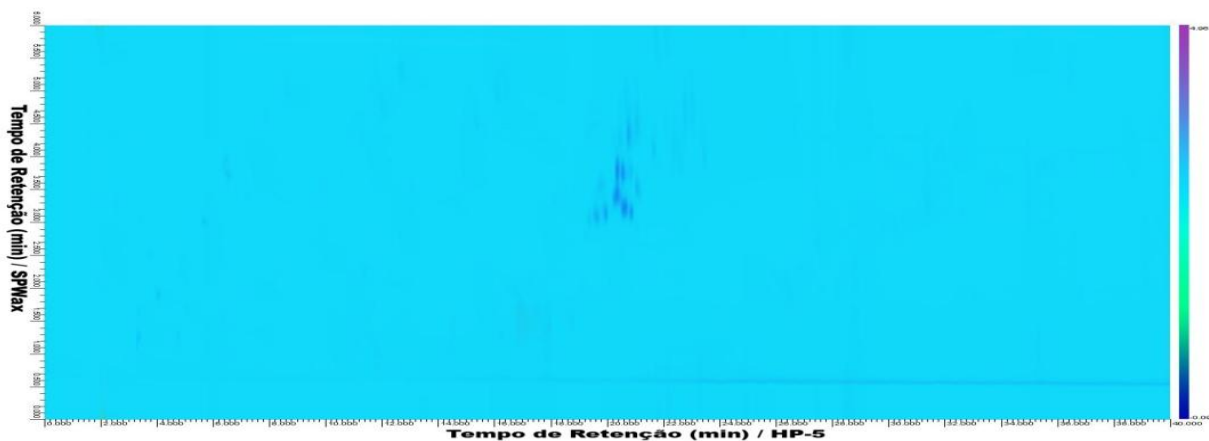
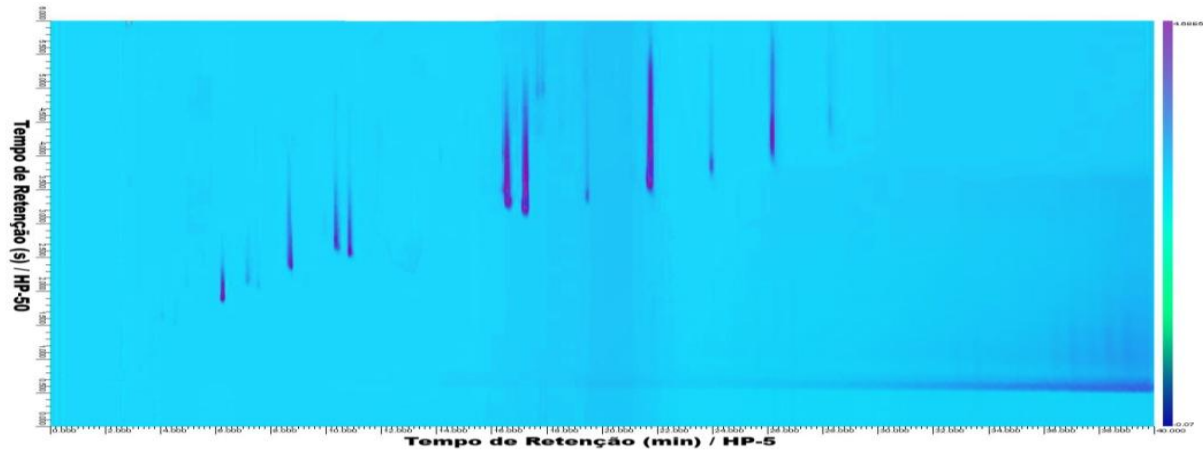


Figura 22. Representação gráfica dos pesos por MPCA para separação de biodieseis de soja feito com óleo novo e envelhecido por MPCA para um conjunto de coluna 1 (A) pesos positivos (B) pesos negativos

(A)



(B)

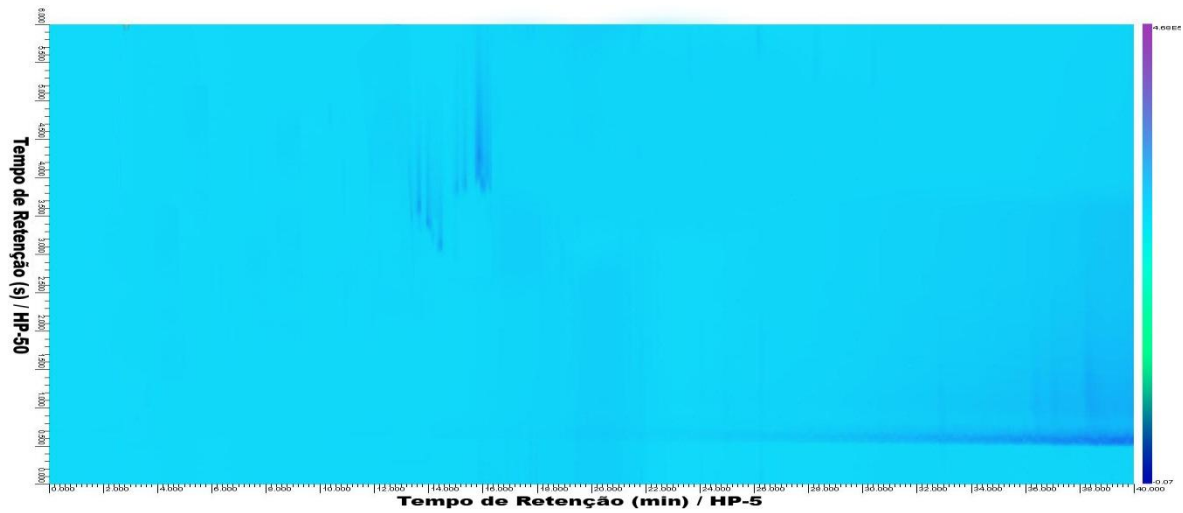
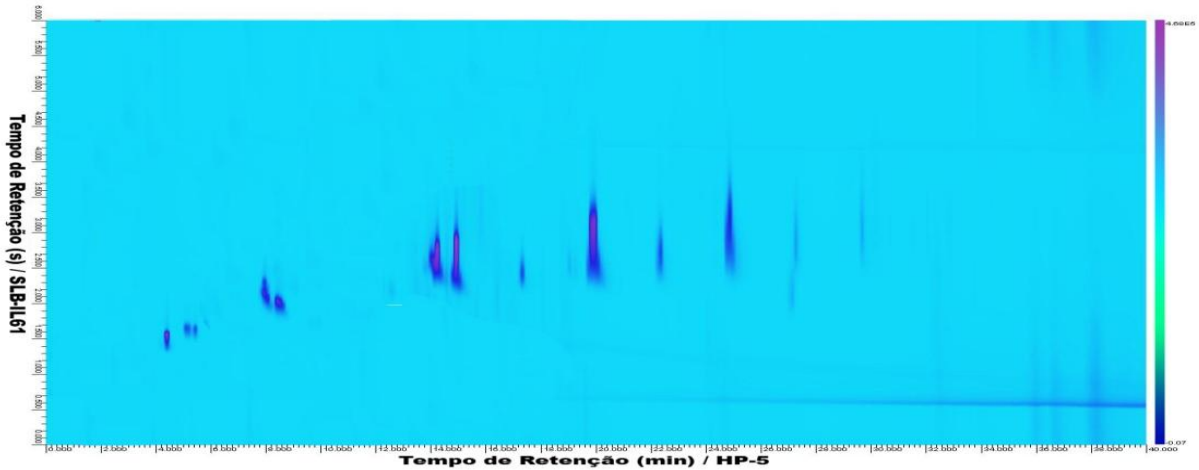
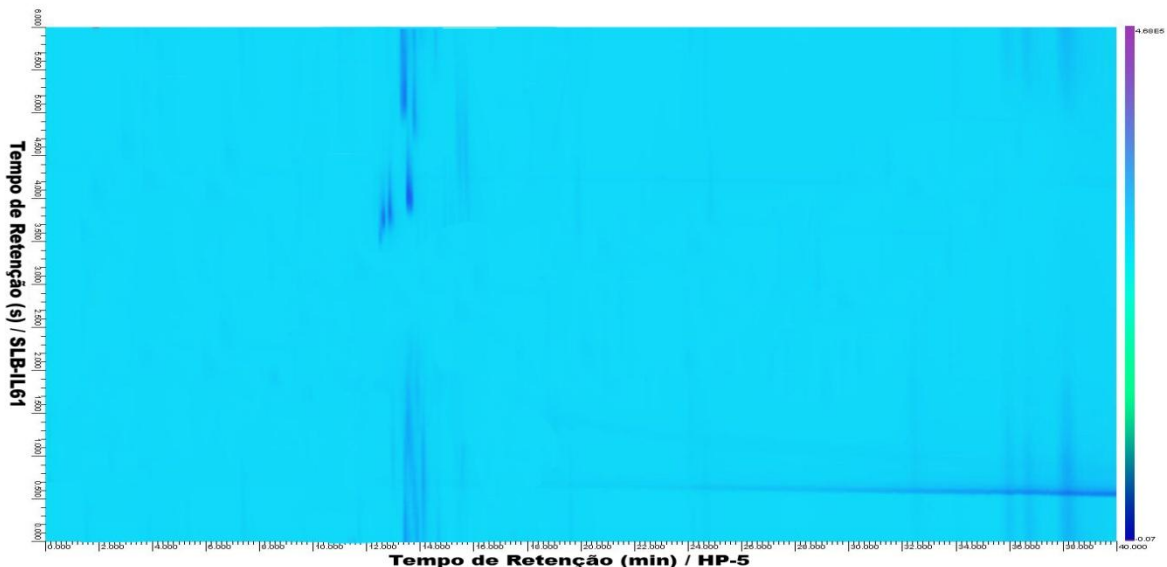


Figura 23. Representação gráfica dos pesos por MPCA para separação de biodieseis de soja feito com óleo novo e envelhecido por MPCA para um conjunto de coluna 2 (A) pesos positivos (B) pesos negativos.

(A)



(B)



**Figura 24.** Representação gráfica dos pesos por MPCA para separação de biodieseis de soja feito com óleo novo e envelhecido por MPCA para um conjunto de coluna 3(A) pesos positivos (B) pesos negativos.

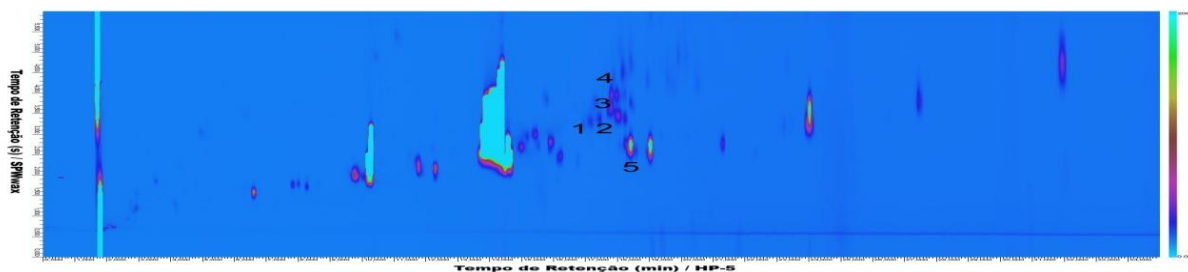
As três combinações de colunas conseguiram separar os biodieseis de soja de diferentes tempos de envelhecimento. No entanto, na figura 22 e 24 é mostrado que nos conjuntos de colunas 1 e 3 (A e C) obteve-se uma maior separação entre eles. A grosso modo, a diferença entre estes biodieseis é a diminuição da concentração de

alguns ésteres metílicos saturados e o aumento de uns ésteres metílicos insaturados, como se pode notar nas figuras 22, 23 e 24.

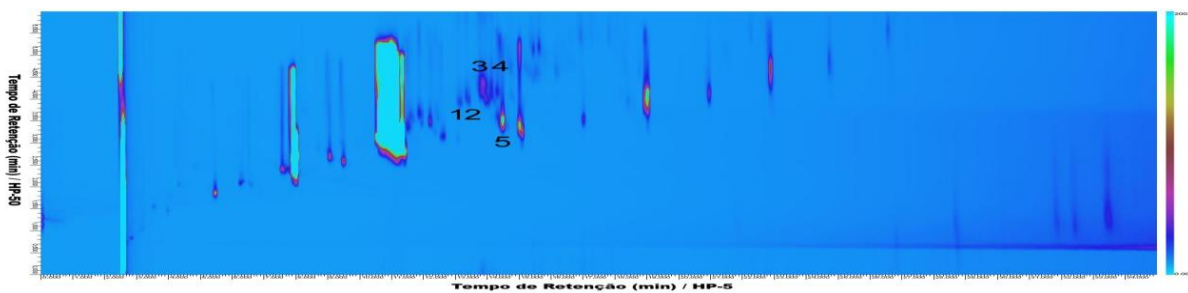
A resolução destes compostos insaturados na segunda dimensão aumenta conforme o aumento da polaridade do filme da fase estacionária já que se cria um maior espaçamento entre os compostos insaturados e, entre eles e compostos saturados. As medidas de resolução foram calculadas para cada conjunto de coluna, as quais são observadas na tabela 10, e os compostos são enumerados na figura 25.

A resolução resultou ser de uma ordem de grandeza de duas vezes maior em um conjunto de coluna 3 ( $^2D$  altamente polar) em relação ao conjunto 1 ( $^2D$  polar) e de oito vezes maior em relação ao conjunto de colunas 2 (medianamente polar)

(A)



(B)



(C)

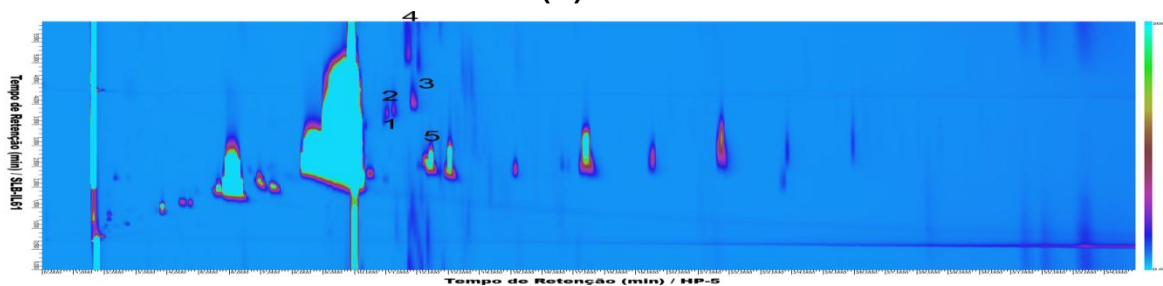


Figura 25. Perfis cromatográficos de biodieséis de óleo de soja envelhecido analisados em diferentes conjuntos de colunas (A) conjunto 1, (B) conjunto 2, (C) conjunto 3.

**Tabela 6. Resolução determinada pelo Teorema de Pitágoras para picos adjacentes com relação ao pico correspondente C20:1n-6 (5).**

<b>HP-5 / SupelcoWax Conjunto 1</b>			
<b>Símbolo</b>	<b>R<sub>s,x</sub></b>	<b>R<sub>s,y</sub></b>	<b>R<sub>sxy</sub></b>
C20:4n-6 (1)	20,6±0,5	15,8±0,5	272,75±0,05
C20:5n-3 (2)	16,8±0,4	19,2±0,7	387,01±0,05
C20:3n-6 (3)	10,9±0,8	26,7±0,7	725,92±0,07
C20:5n-3 (4)	15,4±0,8	28,4±0,8	±0,8
<b>DB-5 / HP-50 Conjunto 2</b>			
<b>Símbolo</b>	<b>R<sub>s,x</sub></b>	<b>R<sub>s,y</sub></b>	<b>R<sub>sxy</sub></b>
C20:4n-6 (1)	10±1	7,9±0,5	73,2±0,2
C20:5n-3 (2)	9,2±0,8	8,8±0,6	86,4±0,2
C20:3n-6 (3)	6,9±0,7	3,1±0,3	16,9±0,3
C20:5n-3 (4)	7,8±0,8	5,2±0,8	±0,8
<b>DB-5 / SLB-IL61 Conjunto 3</b>			
<b>Símbolo</b>	<b>R<sub>s,x</sub></b>	<b>R<sub>s,y</sub></b>	<b>R<sub>sxy</sub></b>
C20:4n-6 (1)	12,0±1,0	23±2	555,4±0,2
C20:5n-3 (2)	11,0±0,8	29,2±0,5	863,6±0,1
C20:3n-6 (3)	4,7±0,3	32,01±0,8	1029,4±0,1
C20:5n-3 (4)	5,0±0,8	62,4±0,8	±0,8

Embora possam ser observados estes compostos nos perfis cromatográficos, foi aproveitado o gráfico de pesos do MPCA para melhor observação dos compostos responsáveis pela separação obtida e sua contribuição no gráfico de escores.

As regiões do cromatograma onde as áreas do pico aumentam nos dois tipos de biodieseis de soja são denominadas contribuições positivas, estas também obedecem aos compostos comuns nos dois tipos de amostras. Estas regiões correspondem aos compostos C15:0, C14:0, C15:1n-3, C17:0, C17:1, C18:2n-6, C20:1n-6, C21:0, C22:0, C23:0, C24:0, estas contribuições podem ser observadas nas figuras 22A, 23A e 24A.

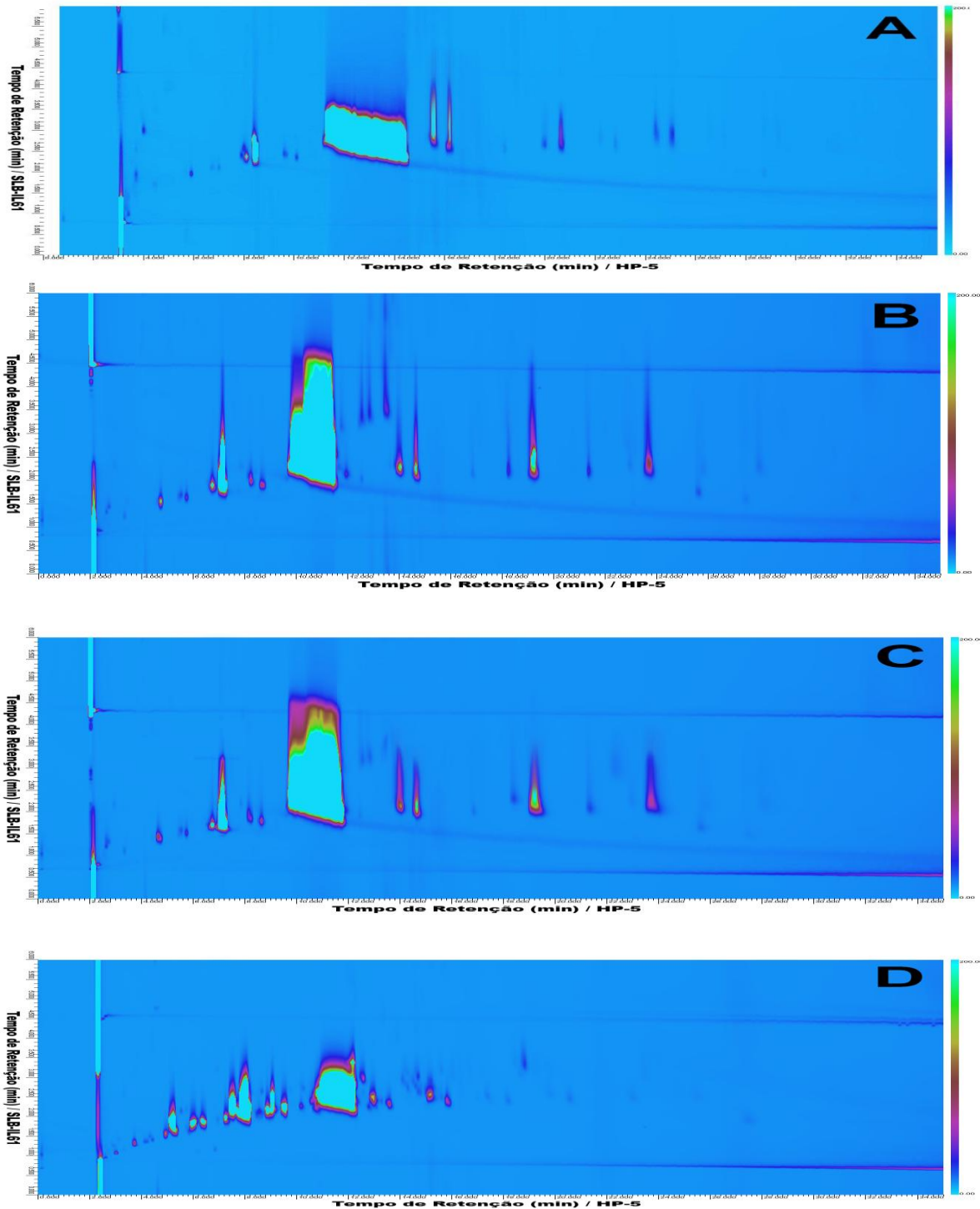
Por outra parte as regiões do cromatograma onde as áreas do pico diminuem nos dois tipos de biodieseis de soja são denominadas contribuições negativas, as quais obedecem aos compostos que diferentes entre as duas amostras, ditas regiões correspondem aos compostos C20:3n-3, C20:3n-6, C20:4n-6 e C20:5n-3, estas contribuições podem ser observadas nas figuras 22B, 23B e 24B.

O conjunto de coluna que melhor conseguiu diferenciar biodieseis de soja com diferentes tempos de envelhecimento foi o conjunto 3 (HP-5/SLB-IL61), portanto este foi o utilizado para diferenciar biodieseis de diversas fontes.



## 5.4 Avaliação de biodieseis de diferentes procedências e matérias primas

Os perfis cromatográficos para cada matéria prima são mostrados na figura 26.



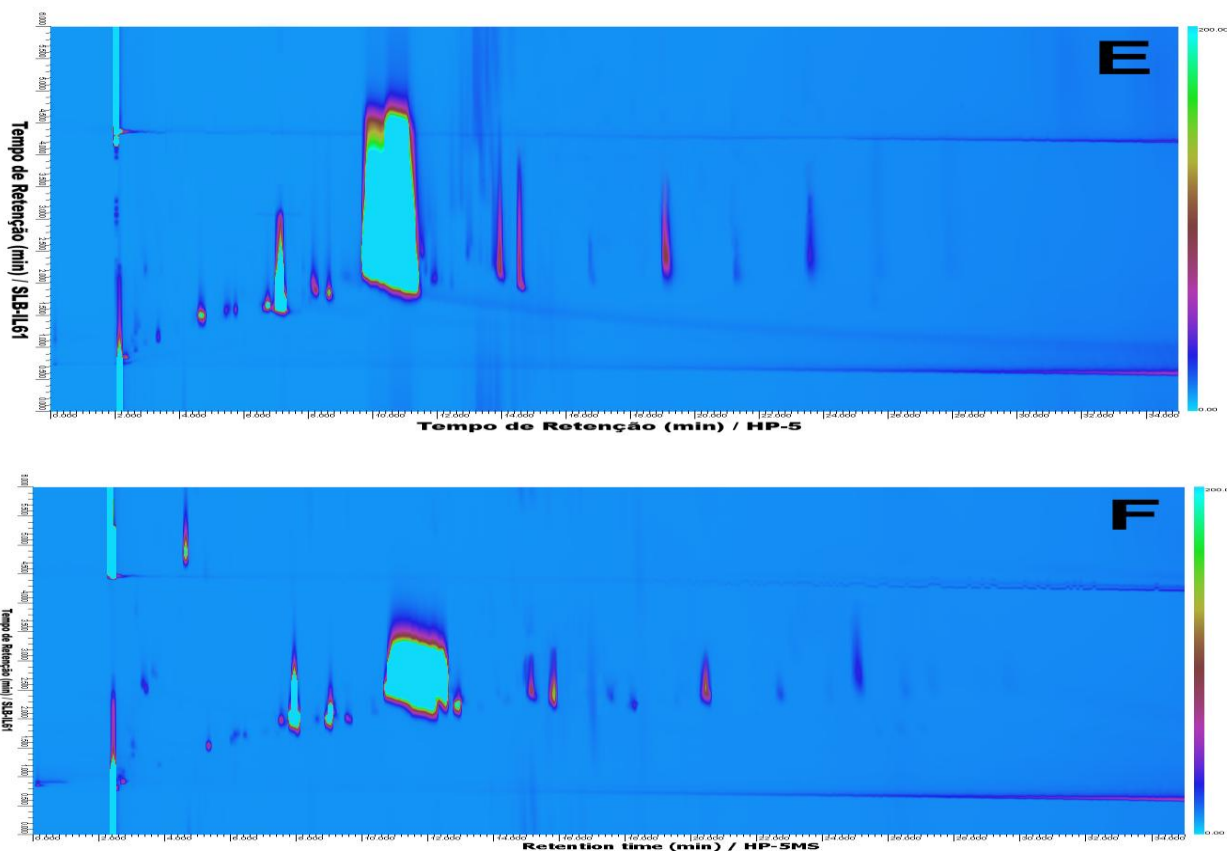


Figura 26. Cromatogramas de biodieseis de diferentes matérias primas adquirido no sistema GCxGC-FID com o conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação 6 s; vazão 0,7 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição: 100 Hz temperatura do injetor e detector: 250 e 275°C respectivamente; (A) óleo de canola, (B) óleo de girassol, (C) óleo de milho (D) sebo bovino, (E) óleo de soja recuperado. (F) soja não processada.

O número de componentes principais escolhidas para a análise exploratória foi de 2, os quais explicam uma variância de 98,3 %. O gráfico de escores é mostrado na figura 27.

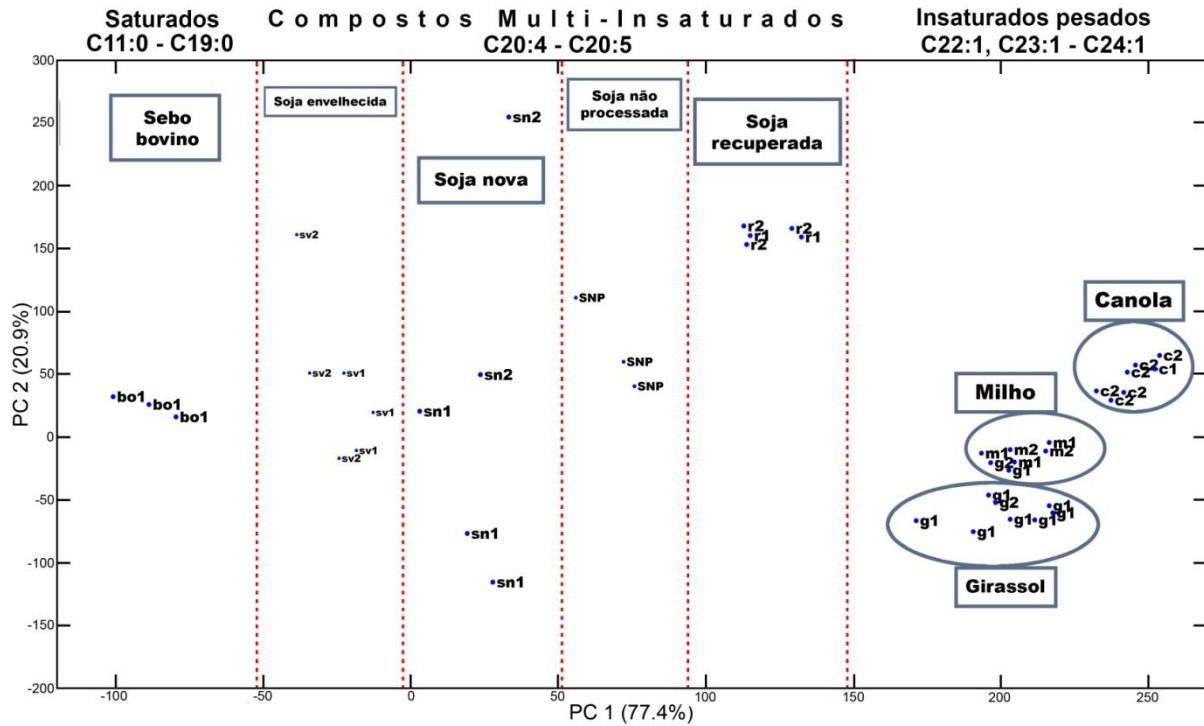


Figura 27. Representação gráfica dos PC para diferenciação de biodieseis feitos com diferentes matérias primas por MPCA.

Para determinar se o modelo estava ajustado foi gerado o gráfico de resíduos Q versus  $T^2$  Hotelling, mostrado na figura 28

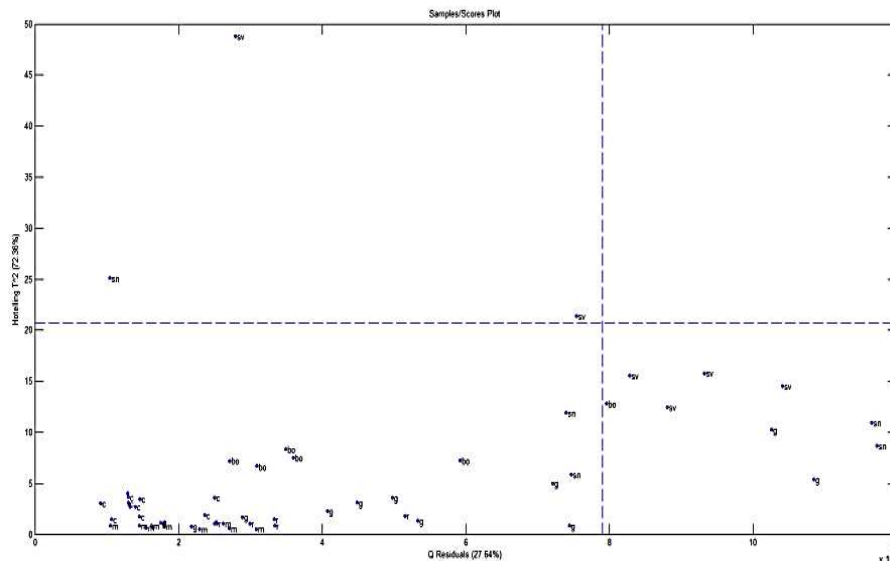
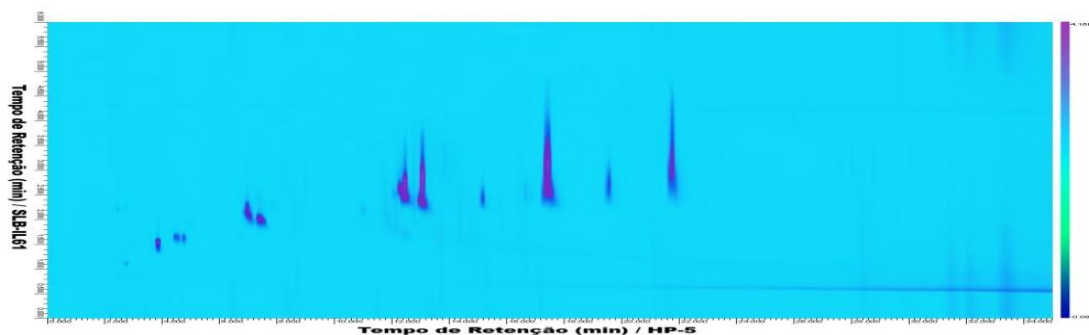


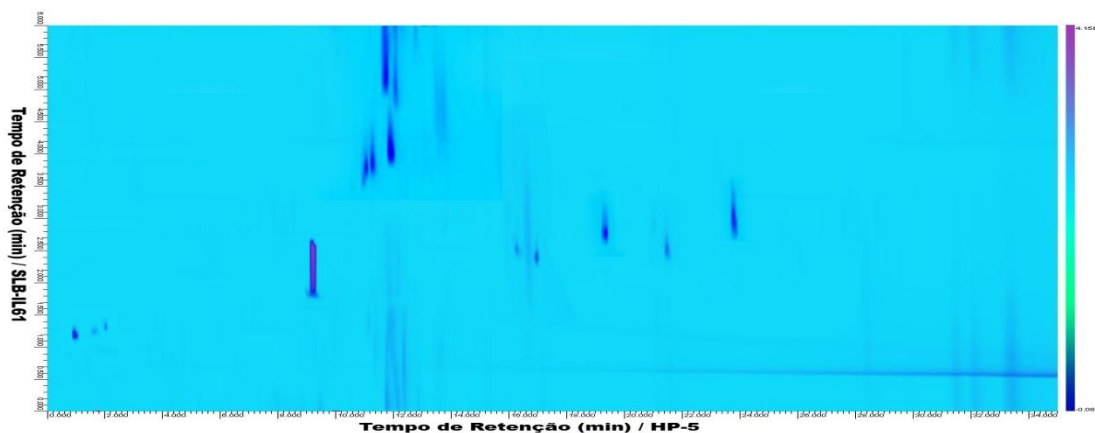
Figura 28. Gráfico de Q resíduos versus  $T^2$  de Hotelling para as amostras de biodiesel de diferentes matérias primas, avaliação de *outliers* ao 95 % de confiança.

Conclui-se que o modelo estava ajustado, pois não tinha nenhuma amostra *outlier* (fora dos limites estabelecidos), foram fornecidos os gráficos de pesos na figura 29.

(A)



(B)



**Figura 29.** Representação gráfica dos pesos para separação de biodieseis de soja feito com óleo novo e envelhecido por MPCA para um conjunto de coluna 3 (A) pesos positivos (B) pesos negativos.

Na figura 27. Encontrou-se uma boa separação para todos os grupos.

Observou-se que os ácidos graxos formados são bastante diversos entre biodieseis de diferentes matérias primas, a concentração dos marcadores (compostos característicos encontrados em todos os tipos de biodiesel) mudam significativamente [6]. Os compostos minoritários dos biodieseis em comuns foram os seguintes: tetradecanoato de metila, C14:0; heptadecanoato de metila, C17:0; 12-heptadecanoato, C17:1; 14-eicosenoato de metila, C20:1n-6; cis 11,14 eicosadieno de metila, C20:0; docosanoato de metila, C22:0; tricosanoato de metila, C23:0; tetracosanoato de metila, C24:0; estes mudaram em concentrações de uma matéria prima a outra.

O primeiro grupo da esquerda da figura 27 composto por biodiesel de sebo bovino formado somente por ácidos graxos saturados C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0 e C19:0, obtendo-se um perfil bastante diferente aos demais.

O segundo grupo está constituído por biodiesel de óleo de soja envelhecida, nova, não processada e recuperada, que apresentam compostos pesados multiinsaturados os quais são os da família C20:3n-3, C20:3n-6, C20:4n-6 e C20:5n-3. onde o óleo de soja não processada contem um composto a mais diferente dos outros biodieseis como o C21:1n-6.

O terceiro grande grupo esta conformado por biodieseis de óleo de girassol, milho e canola que apresenta compostos insaturados pesados como C23:1n-9, C22:1n-9, C24:1n-9.

Embora possa se fazer uma mera inspeção visual dos compostos que diferem nos biodieseis de diversas matérias primas, por meio dos perfis cromatográficos, o gráfico de pesos indica a contribuição de cada composto na separação obtida no gráfico de escores.

Enquanto aos gráficos de pesos, na figura 29A mostra-se as contribuições positivas as quais correspondem às regiões do cromatograma onde as áreas dos picos aumentam, estes a sua vez também são os compostos comuns entre todos os biodieseis das diferentes matérias primas, os compostos que aparecem nestas regiões do cromatograma são: tetradecanoato de metila (C14:0), pentadecanoato de metila (C15:0), 13-pentadecenoato de metila (C15:1n-3) heptadecanoato de metila (C17:0), 12-heptadecanoato (C17:1), eicosanoato de metila (C20:0), 14-eicosenoato de metila (C20:1n-6), heneicosanoato de metila (C21:0), docosanoato de metila (C22:0),tricosanoato de metila (C23:0)e tetracosanoato de metila (C24:0).

O gráfico de pesos negativos da figura 29B mostra as regiões do cromatograma onde as áreas dos picos diminuem e, portanto os compostos que diferem entre os biodieseis de diversas fontes, os compostos que aparecem nestas regiões do cromatograma são undecanoato de metila (C11:0), dodecanoato de metila (C12:0)nonadecanoato de metila (C19:0), eicosapentaenoato de metila (C20:3n-3), 8,11,14-eicosatrienoato de metila (C20:3n-6),5,8,11,14-eicosatetraenoato de metila (C20:4n-6), 5,8,11,14,17- eicosapentaenoato de metila (C20:5n-3), 14-eicosenoato de

metila (C21:1n-6), 13-docosenoato de metila (C22:1n-9), tricosenoato de metila (C23:1n-6) e tetracosenoato de metila (C24:1n-9).

Desta maneira observa-se como compostos minoritários nos biodieseis são importantes para classificar-os segundo sua matéria prima, sabendo-se que os mesmos conseguiram ser detectados graças à alta capacidade de separação e detectabilidade do GC×GC.

Se bem agora são conhecidos quais são os compostos que diferem entre os distintos biodieseis, mais importante ainda é o conhecimento de quais regiões do cromatograma são similares, estas partes iguais foram utilizadas para realizar uma curva de calibração única, a qual seria usada para quantificar biodieseis de qualquer matéria prima. Excluindo no modelo matemático onde é aplicado o MCR-ALS, as regiões do cromatograma onde aparecem os compostos que diferem entre os diversos biodieseis.

### **5.5 Quantificação de misturas BXX por o método de resolução de curvas MCR-ALS**

As curvas de calibração foram construídas para o biodiesel de óleo de soja novo. Este biodiesel apresenta os picos mais comuns de todos os tipos de biodiesel de diversas fontes estudadas e por isso, o óleo de soja foi escolhido para a calibração. As curvas foram realizadas variando-se as concentrações de enxofre no diesel mineral, as quais foram de S50, S500 e S1800, e concentrações de biodiesel de óleo de soja novo de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 % v/v. Para realizar um algoritmo que pudesse ser utilizado para misturas BXX com biodieseis de qualquer matéria prima, os compostos C20:4n-6, C20:5n-3, C20:3n-3 e C20:3n-6, existentes nos biodieseis de soja, milho e girassol, foram retirados, já que o biodiesel de canola não os contém. Assim, estes foram excluídos da construção da curva de calibração de misturas BXX.

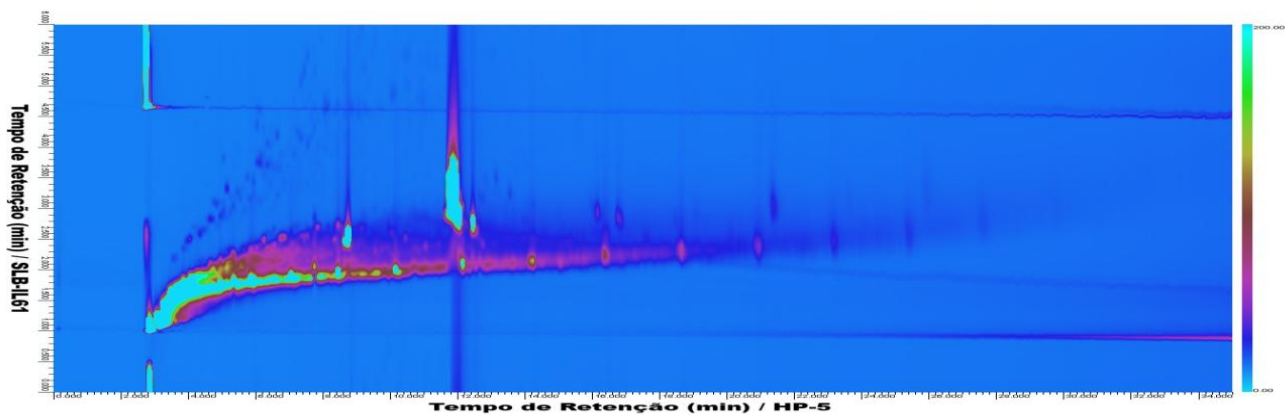


Figura 30. Cromatograma de biodiesel de soja em diesel mineral S50, mistura B20 adquiridos no sistema GC×GC-FID, com o conjunto de coluna3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6 s; vazão 0,7 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respectivamente.

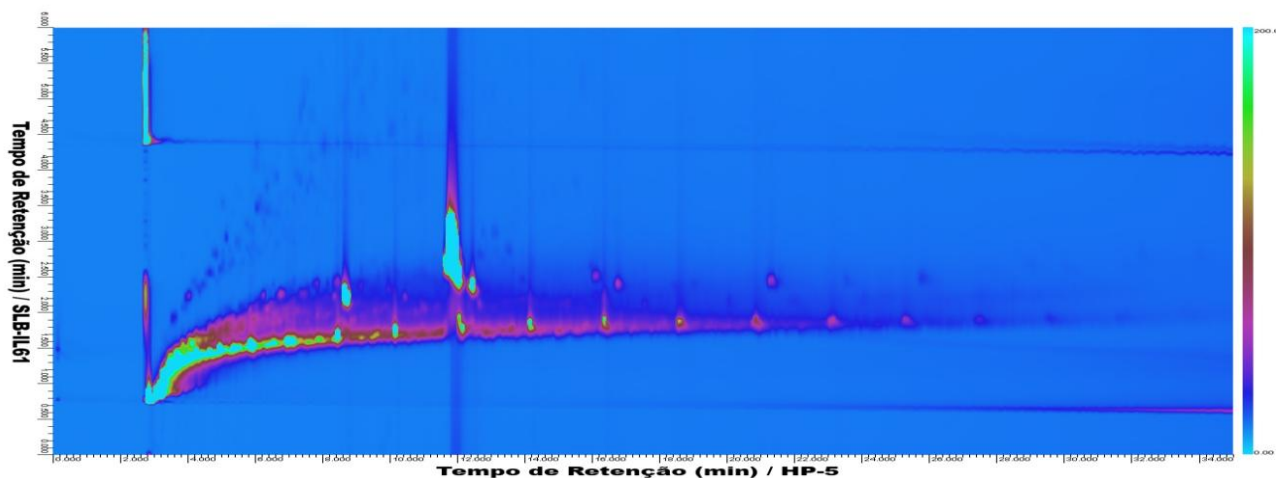
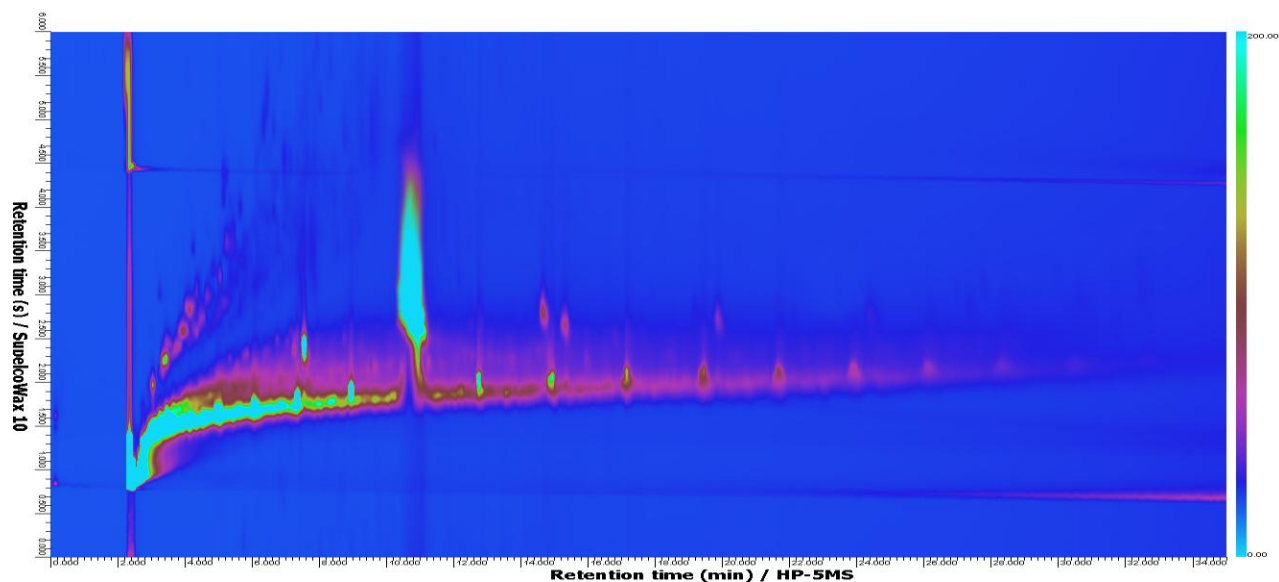


Figura 31. Cromatograma de biodiesel de soja em diesel mineral S500, mistura B20 adquiridos no sistema GC×GC-FID, com o conjunto de coluna3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6 s; vazão 0,7 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respectivamente.



**Figura 32.** Cromatograma de biodiesel de soja em diesel mineral S1800, mistura B20 adquiridos no sistema GC×GC-FID, com o conjunto de coluna3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6 s; vazão 0,7 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respectivamente.

As amostras utilizadas para a validação foram as misturas BXX 3,0; 5,0; 10,0; 20,0% v/v, de óleo de soja, óleo de milho, óleo de girassol, canola e suas respectivas misturas.

Para os biodieseis de óleos de milho e girassol foram excluídas as regiões onde aparecem os compostos C22:1n-9, C20:4n-6, C20:5n-3, C20:3n-6 e C20:3n-3, por ultimo para o biodiesel de óleo de canola foram excluídas as regiões onde aparecem os compostos C22:1n-9, C23:1n-9 e C24:1n-9 para poder quantificar todos em uma curva de calibração única construída com biodiesel de óleo de soja. Desta maneira, foi testada a robustez da curva de calibração obtida para quantificar misturas BXX de biodieseis de girassol, milho, e suas respectivas misturas.



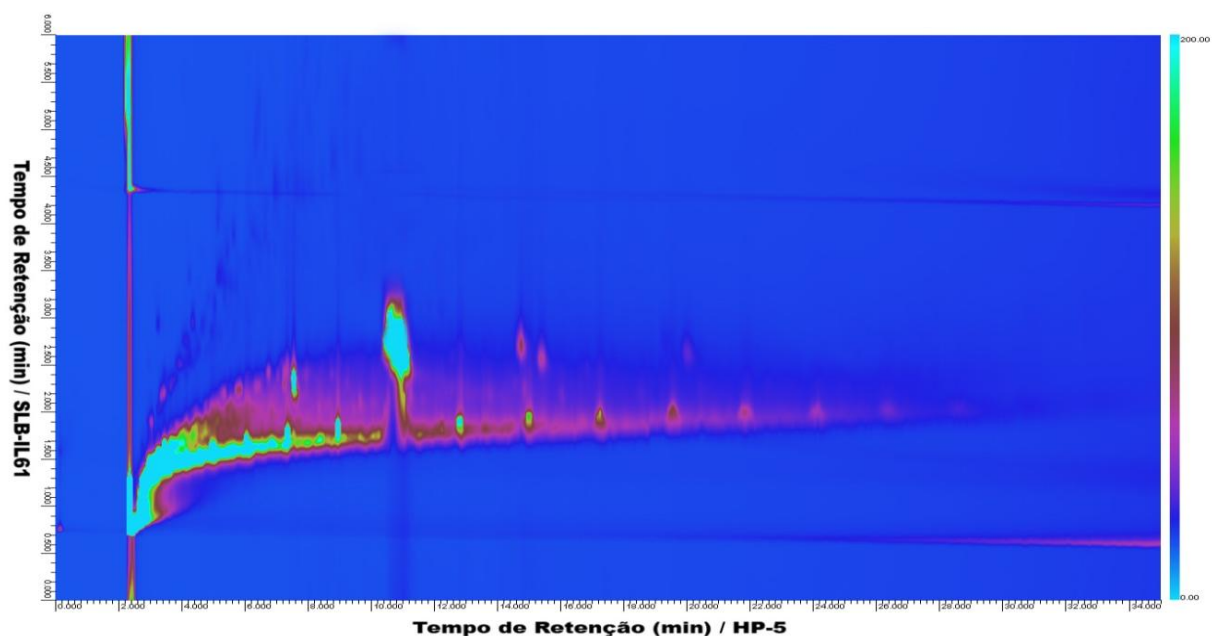


Figura 33. Cromatograma de biodiesel de milho em diesel mineral S500, mistura B20 adquiridos no sistema GC×GC-FID, com o conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6 s; vazão 0,7 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respetivamente.

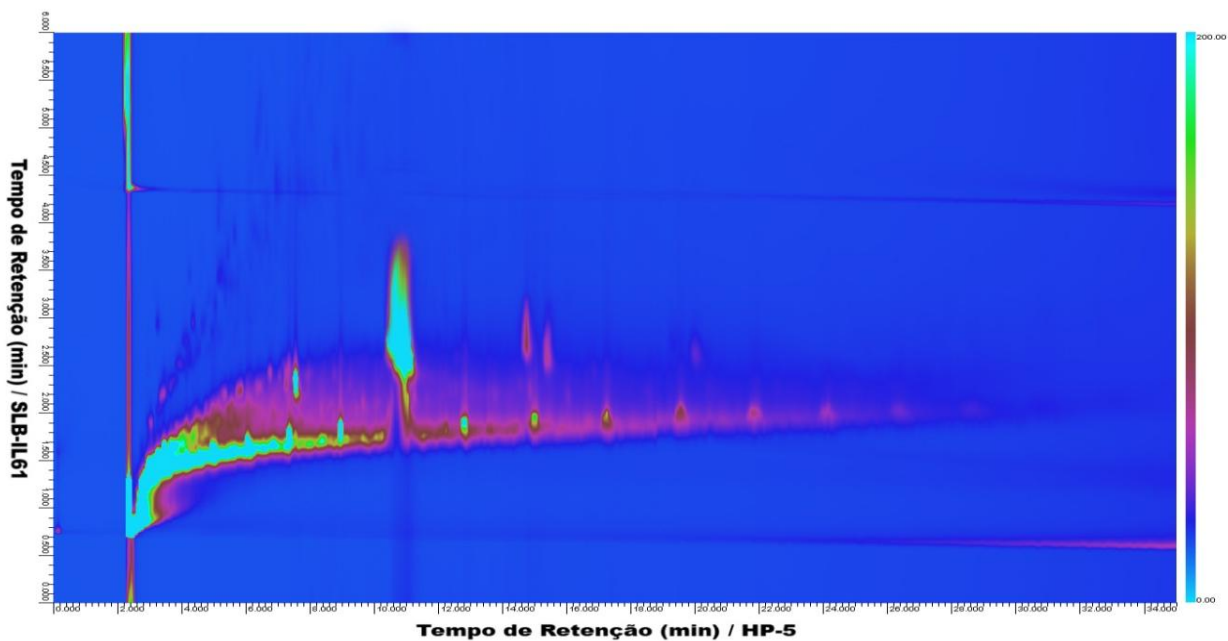


Figura 34. Cromatograma de biodiesel de girassol em diesel mineral S500, mistura B20 adquiridos no sistema GC×GC-FID, com o conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6 s; vazão 0,7 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respetivamente.

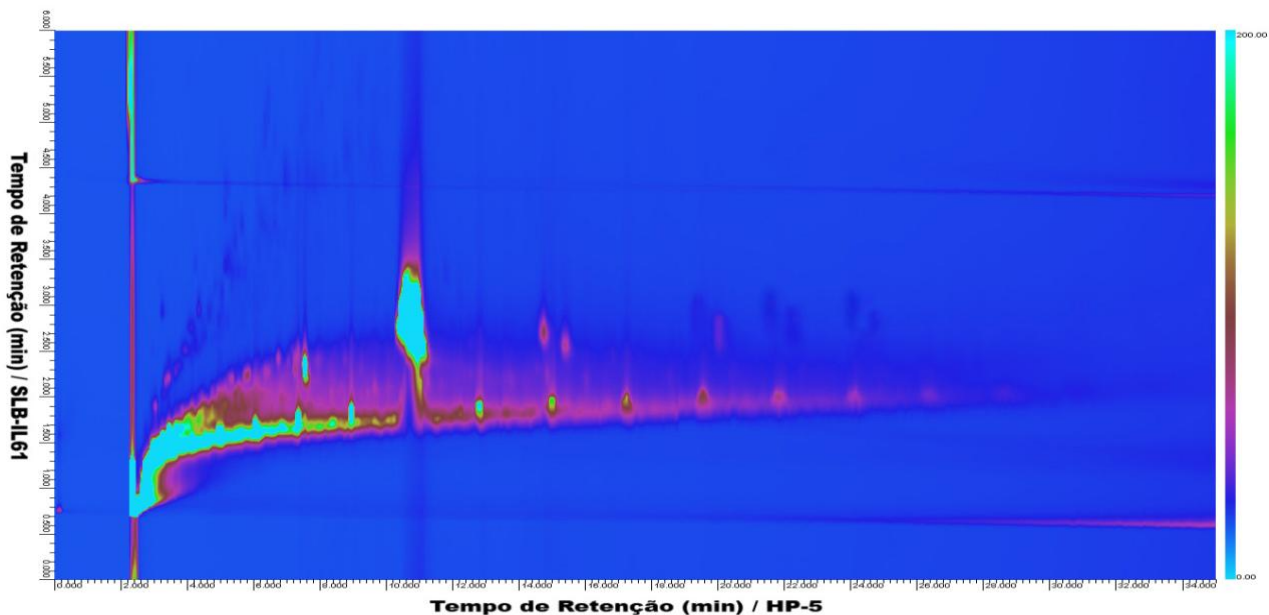


Figura 35. Cromatograma de biodiesel de canola em diesel mineral S500, mistura B20 adquiridos no sistema GCxGC-FID, com o conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6 s; vazão 0,7 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respectivamente.

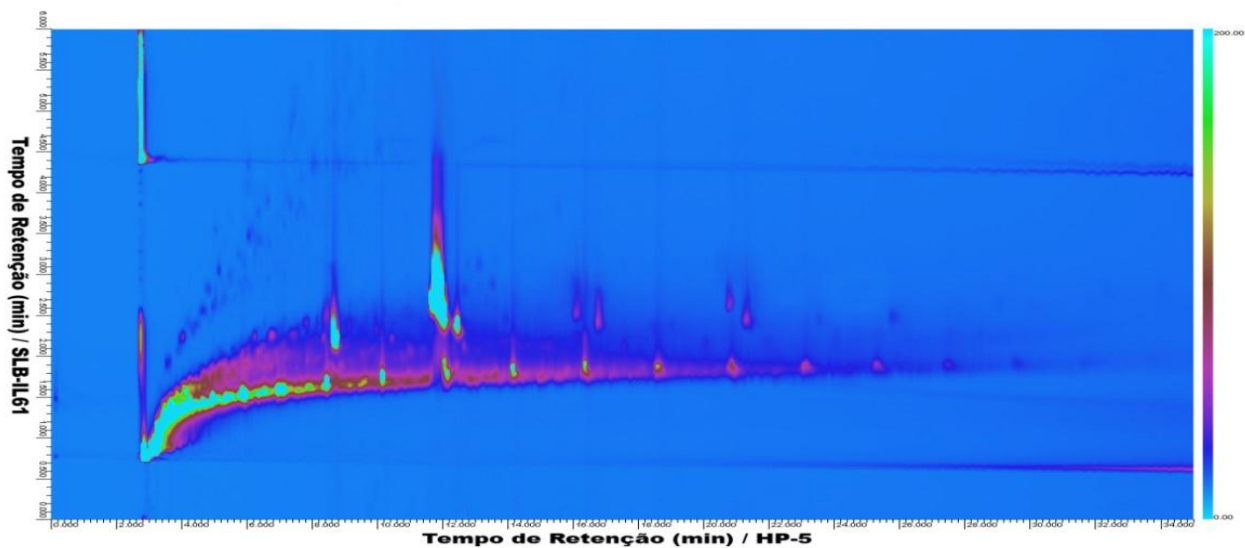


Figura 36. Cromatograma de biodiesel de uma mistura de soja, canola, milho e girassol em diesel mineral S500, mistura B20 adquiridos no sistema GCxGC-FID, com o conjunto de coluna 3. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> até 275 °C; período de modulação de 6s; vazão 0,7 mL min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 100 Hz; temperatura do injetor e detector 250 e 275 °C, respectivamente.

Os cromatogramas foram desdobrados e alinhados, As estimativas iniciais foram os perfis puros de diesel mineral com as diferentes concentrações de enxofre S50, S500, S1800 e os perfis puros de biodiesel de soja, canola, milho e girassol.

Os cromatogramas resolvidos (perfis de amostras recuperadas) para misturas biodieseis de óleo de soja com S50, S500 e S1800 são mostrados nas figuras 37, 38 e 39, observando-se a existência de uma grande similaridade com os cromatogramas das amostras puras e as amostras resolvidas pelo modelo MCR, mostrando os compostos que foram utilizados para quantificar o biodiesel no diesel mineral.

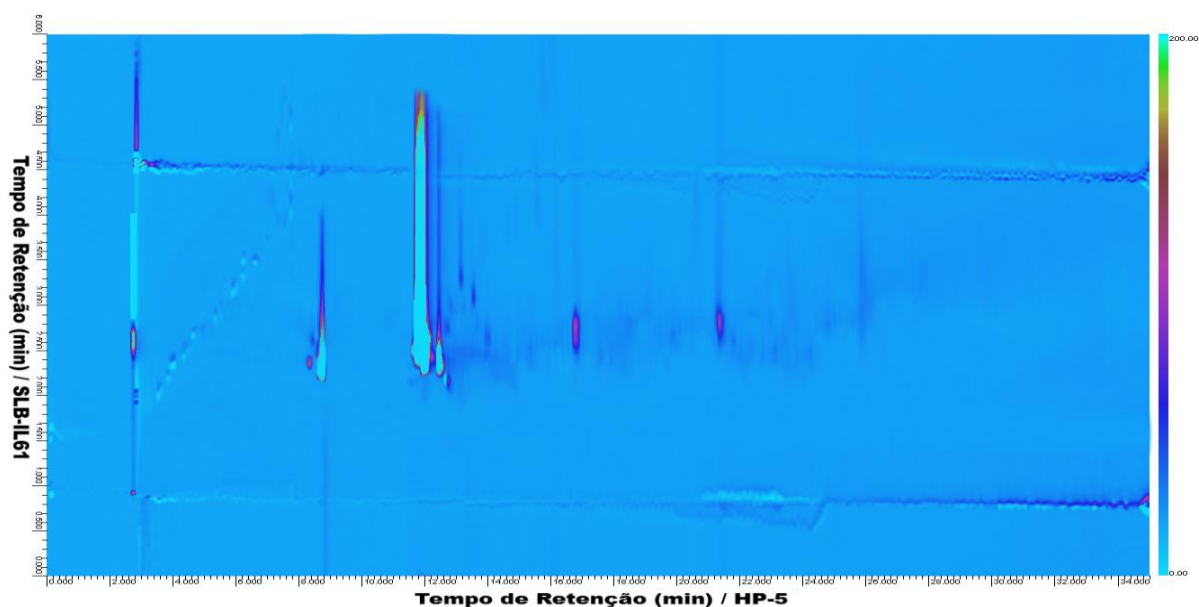


Figura 37. Perfil recuperado de uma mistura BXX biodiesel de óleo de soja e diesel mineral S50.

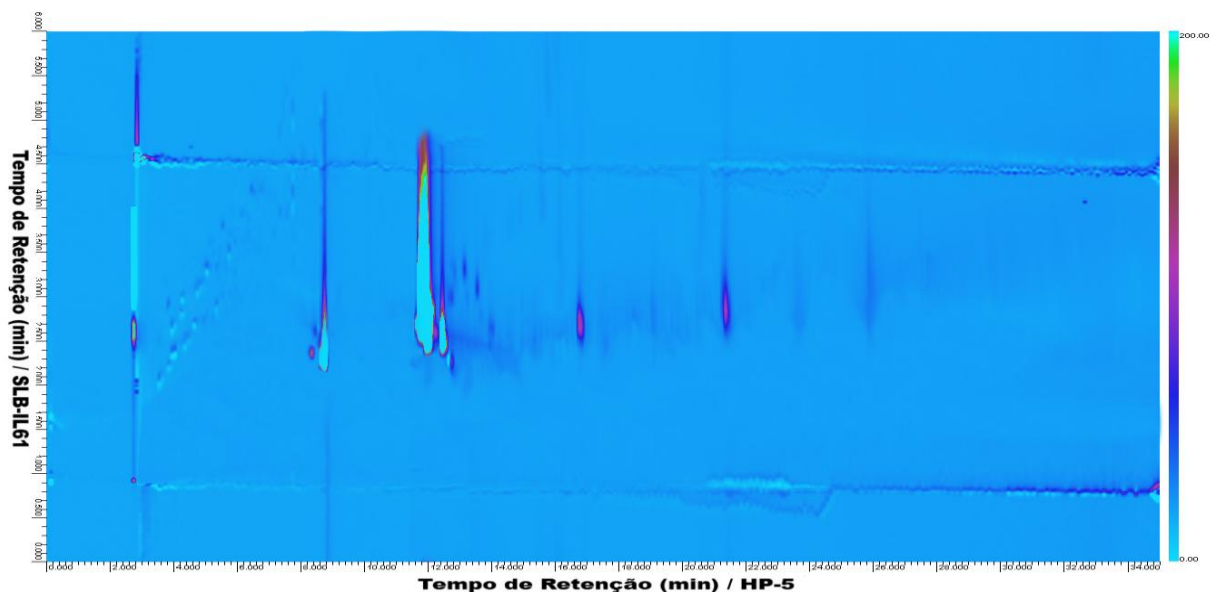


Figura 38. Perfil recuperado de uma mistura BXX biodiesel de óleo de soja e diesel mineral S500.

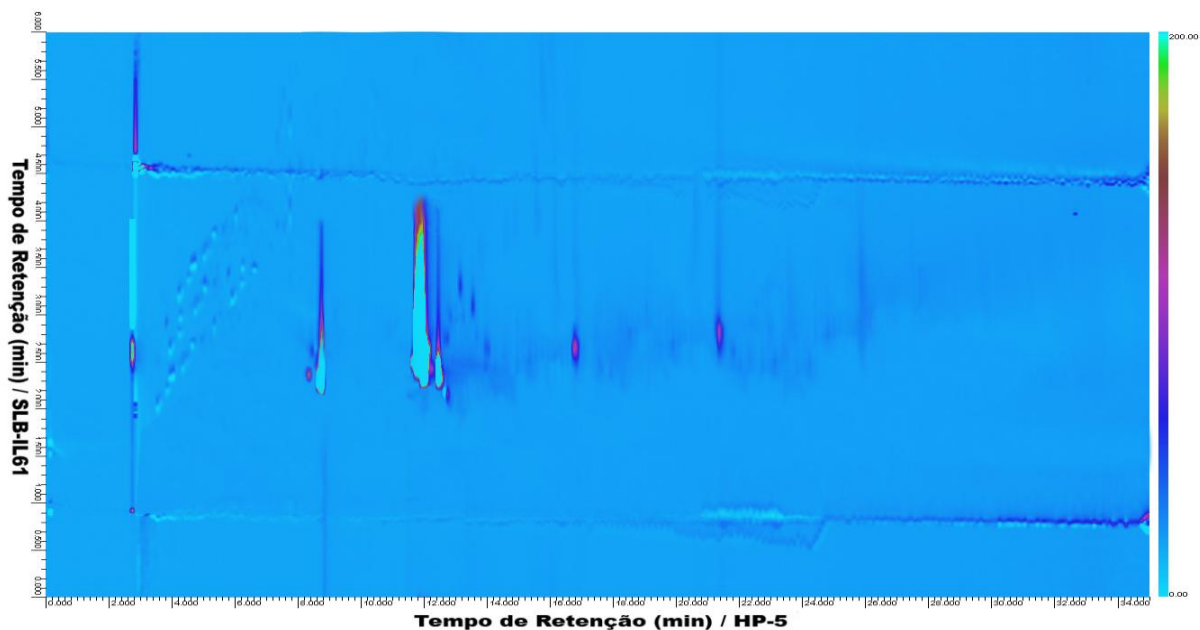


Figura 39. Perfil recuperado de uma mistura BXX biodiesel de óleo de soja e diesel mineral S1800.

Em seguida, as curvas de calibração foram construídas a partir das concentrações das misturas BXX e os valores fornecidos pelo programa do MCR-ALS. Para a curva biodiesel de soja e diesel mineral S50, o coeficiente de correlação foi de 0,9972; para o diesel mineral S500, o coeficiente de correlação foi de 0,9975, e por último para o diesel mineral S1800, foi de 0,9970.

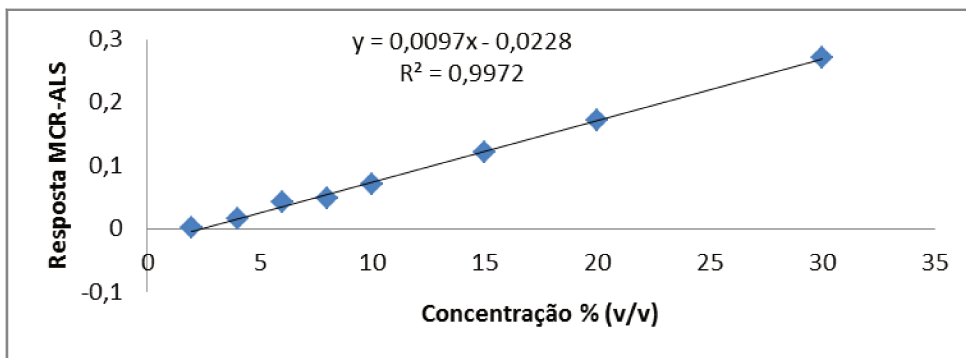


Figura 40. Curva de calibração analítica, concentração de biodiesel de soja em óleo diesel S50 versus valores fornecidos pelo modelo do MCR-ALS.

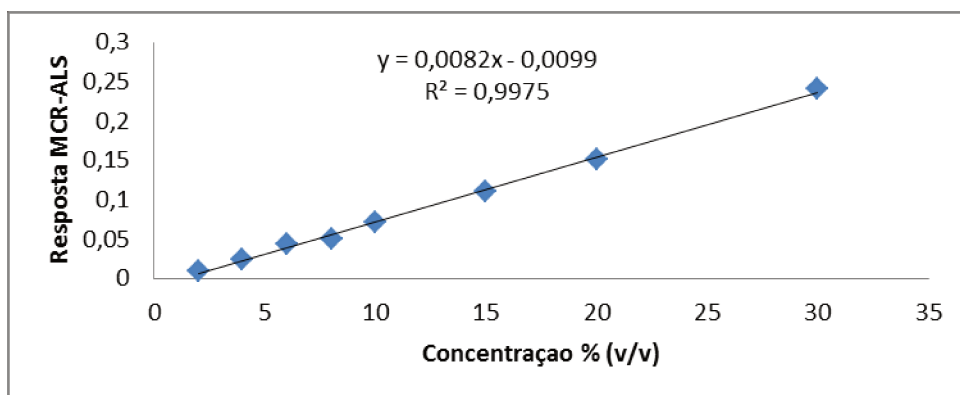


Figura 41. Curva de calibração analítica, concentração de biodiesel de soja em óleo diesel S500 versus valores fornecidos pelo modelo do MCR-ALS.

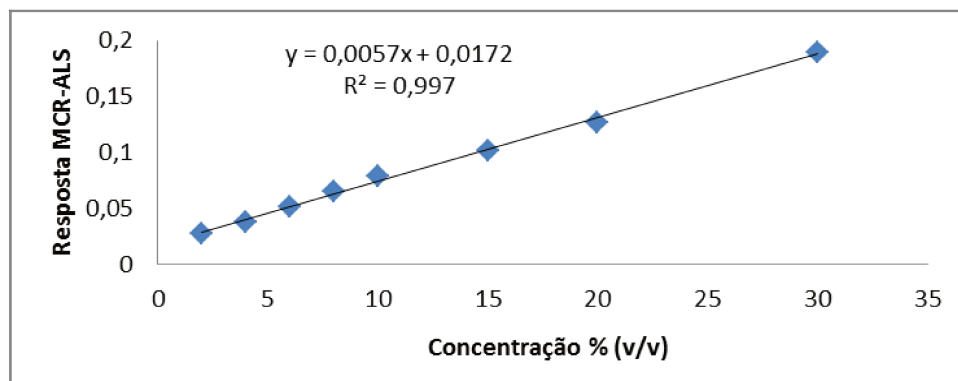


Figura 42. Curva de calibração analítica, concentração de biodiesel de soja em óleo diesel S1800 versus valores fornecidos pelo modelo do MCR-ALS.

As previsões para as concentrações estimadas de biodiesel de óleo de soja em diesel mineral realizaram-se mediante a interpolação na curva de calibração dos resultados de concentração proporcionada pelo modelo MCR-ALS para estas amostras.

A tabela 11 mostra as concentrações calculadas para os biodieseis e o erro absoluto para cada amostra na validação. A raiz quadrada do desvio percentual do erro (RMSPD) foi calculada mediante a equação (7)

$$RMSPD = 100 \times \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_{pred(i)} - y_{ref(i)})^2}{(y_{ref(i)})^2}} \times \frac{1}{n} \quad (7)$$

Da mesma maneira foi calculado o erro quadrático médio da previsão (RMSEP) a, equação (8). onde onde  $y_{pred}$  são as concentrações previstas,  $y_{ref}$  as concentrações reais dos biodieseis e  $n$  é o numero de amostras da previsão.

$$RMSPE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_{pred} - y_{ref})^2} \quad (8)$$

**Tabela 7. Concentrações calculadas e reais de biodiesel de soja em diesel mineral para a validação da curva obtida. valores em % (v / v), erros absolutos e erro relativo em (% , v / v)**

<b>BXX biodiesel de óleo de soja em diesel mineral S50</b>			
<b>Concentração real</b>	<b>Concentração calculada</b>	<b>Erro absoluto</b>	<b>Erro relativo (%)</b>
3	3,08	0,08	2,8
5	5,05	0,06	1,18
10	10,3	0,3	2,67
20	19,3	-0,8	3,5
<b>BXX biodiesel de óleo de soja em diesel mineral S500</b>			
3	3,1	0,1	3,5
5	5,1	0,2	3,5
10	10,5	0,5	5,1
20	19,4	-0,6	2,9
<b>BXX biodiesel de óleo de soja em diesel mineral S1800</b>			
3	3,1	0,1	4,9
5	4,8	-0,2	4,4
10	10,3	0,3	2,8
20	20,8	0,8	3,8

Os gráficos das concentrações calculadas frente às concentrações de referência foram plotadas e os coeficientes de correlação foram de 0,9979, 0,9980 e 0,9994 respectivamente, estes são mostrados nas figuras 43, 44 e 45.

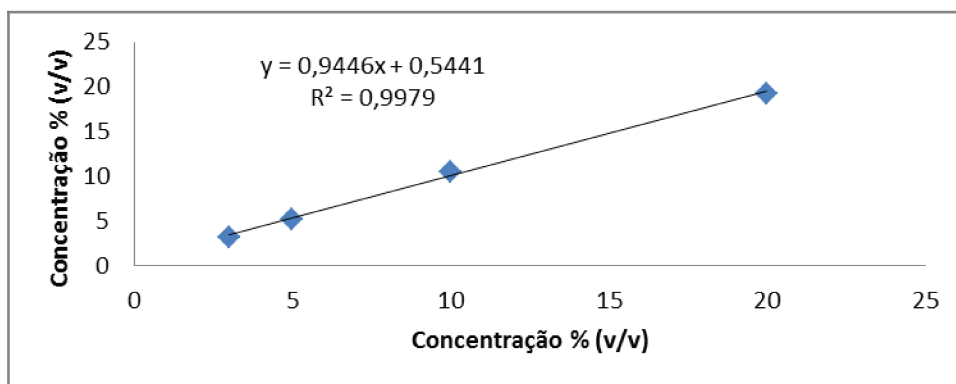


Figura 43. Concentração de biodiesel de soja em diesel S50 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

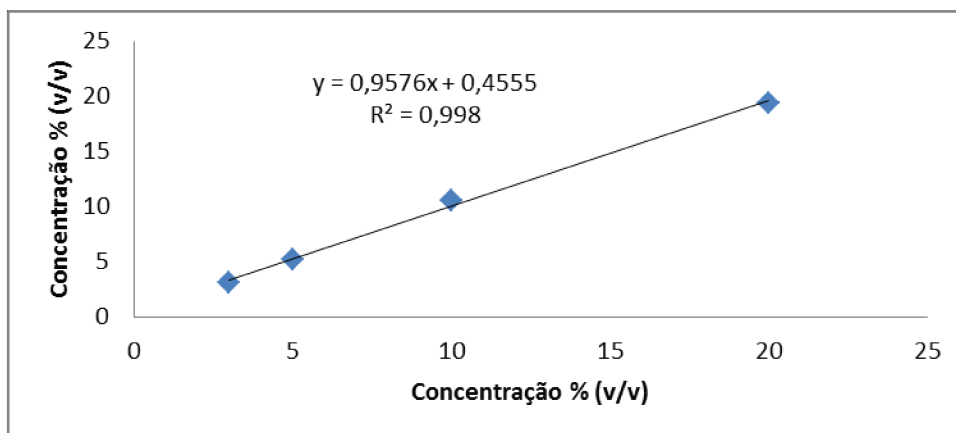


Figura 44. Concentração de biodiesel de soja em diesel S500 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

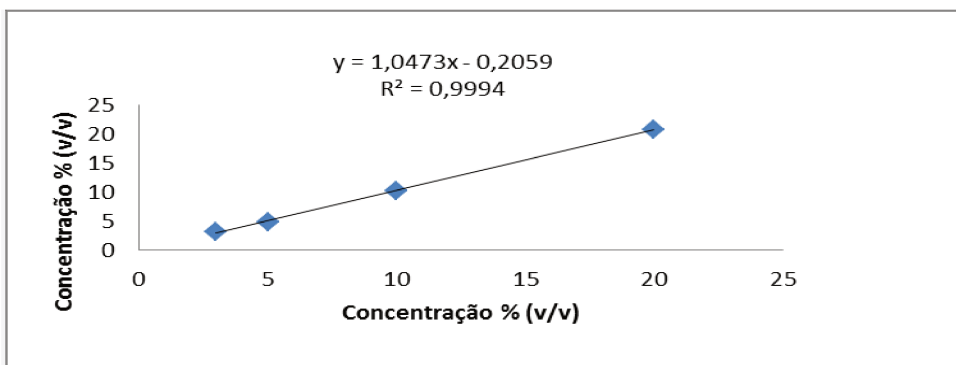


Figura 45. Concentração de biodiesel de soja em diesel 1800 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

Os erros RMSPD e RMSEP para cada mistura BXX nos diferentes diesel minerais são mostrados na tabela 8.

**Tabela 8.** Valores de RMSPD e RMSEP para cada mistura BXX biodiesel de soja em diesel mineral para diversas concentrações de enxofre.

<b>Mistura BXX de biodiesel de soja em diesel mineral S50</b>	
<b>RMSPD</b>	<b>RMSEP</b>
2,70 %	0,38 %
<b>Mistura BXX de biodiesel de soja em diesel mineral S500</b>	
3,50 %	0,39 %
<b>Mistura BXX de biodiesel de soja em diesel mineral S1800</b>	
3,60 %	0,44 %

Como se pode observar, o erro quadrático da previsão foi maior conforme aumento da concentração de enxofre no diesel mineral, no entanto, os valores dos erros são aceitáveis, tomando-se em conta a complexidade da amostra. Os valores calculados são próximos aos valores reais nas amostras, o erro relativo para cada mistura é menor do 5 %.

Da mesma maneira, com estas curvas de calibração para cada diesel mineral, foi testada a robustez do modelo, quantificando-se misturas de biodiesel de óleo de milho. A tabela 9 mostra as concentrações calculadas para os biodieseis de óleo de milho e os erro absoluto e relativos para cada amostra na validação.



Tabela 9. Concentrações calculadas e reais de biodiesel de milho em diesel mineral para a validação da curva obtida. Valores em % (v/v), erros absolutos e erro relativo em (% , v/v)

<b>BXX biodiesel de óleo de milho em diesel mineral S50</b>			
<b>Concentração real</b>	<b>Concentração calculada</b>	<b>Erro absoluto</b>	<b>Erro relativo (%)</b>
3	3,1	0,16	3,8
5	5,2	0,2	3,2
10	10,5	0,5	4,7
20	19,9	-0,6	-0,1
<b>BXX biodiesel de óleo de milho em diesel mineral S500</b>			
3	3,2	0,2	5,2
5	4,8	-0,2	3,8
10	10,5	0,5	5,4
20	20,9	0,9	4,8
<b>BXX biodiesel de óleo de milho em diesel mineral S1800</b>			
3	2,98	0,01	0,4
5	5,2	0,2	4,7
10	10,2	0,2	1,6
20	21,0	1,1	5,1

Os gráficos das concentrações calculadas frente as concentrações de referencia foram plotadas e os coeficiente de correlação foram de 0,9991, 0,9993 e 0,9996, respectivamente.

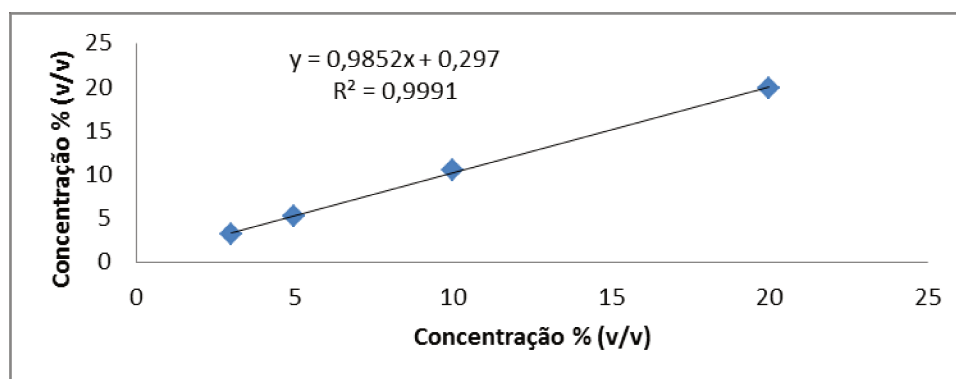


Figura 46. Concentração de biodiesel de milho em diesel S50 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

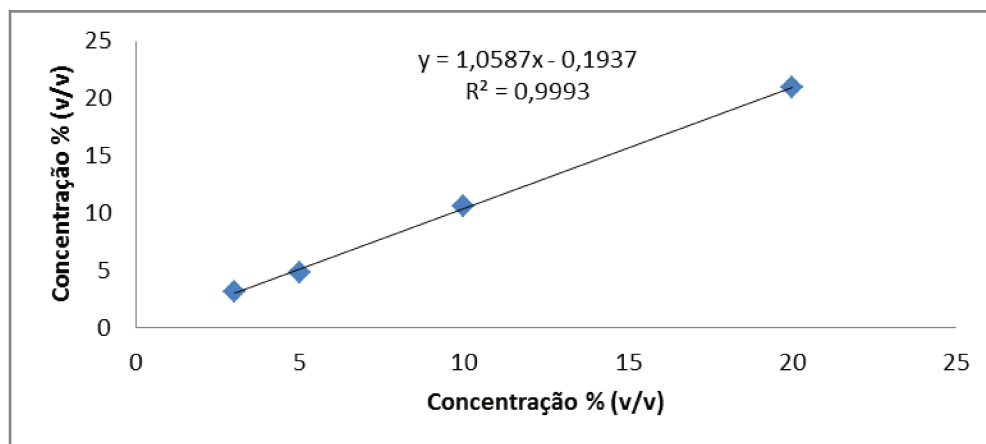


Figura 47. Concentração de biodiesel de milho em diesel S500 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

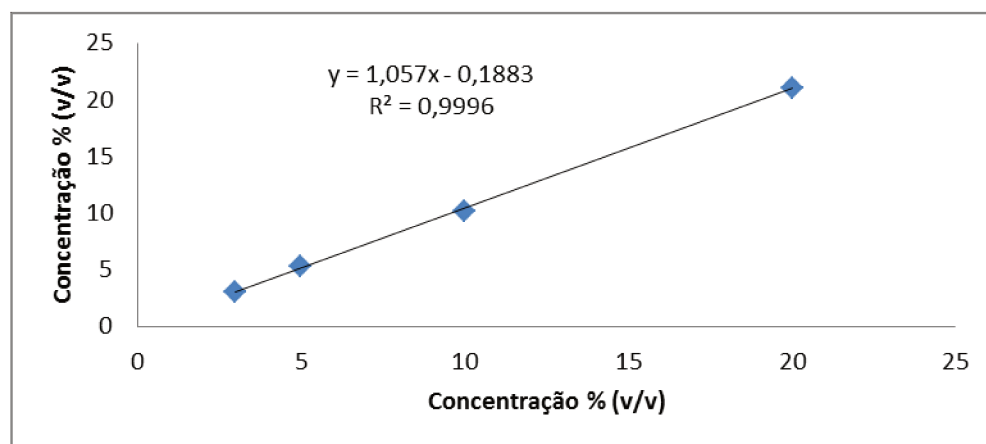


Figura 48. Concentração de biodiesel de milho em diesel S1800 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

Os erros RMSPD e RMSEP para cada mistura BXX nos diferentes diesel minerais são mostrados na tabela 10.

Tabela 10. Valores de RMSD e RMSEP para cada mistura BXX biodiesel de milho em diesel mineral para diversas concentrações de enxofre.

Mistura BXX de biodiesel de milho em diesel mineral S50	
RMSPD	RMSEP
3,61 %	0,28 %
Mistura BXX de biodiesel de milho em diesel mineral S500	
4,41 %	0,56 %
Mistura BXX de biodiesel de milho em diesel mineral S1800	
3,61 %	0,53 %

Da mesma maneira os erros quadráticos são maiores em amostras onde a percentagem de enxofre é maior. Portanto onde a complexidade da amostra aumenta estes valores são maiores que os obtidos para a quantificação de biodiesel de óleo de soja.

A tabela 11 mostra as concentrações calculadas para os biodieseis de óleo de girassol, os erros absoluto e relativos para cada amostra na validação.

**Tabela 11. Concentrações calculadas e reais de biodiesel de girassol em diesel mineral para a validação da curva obtida. Valores em % (v / v), erros absolutos e erro relativo em (% , v / v).**

<b>BXX biodiesel de óleo de girassol em diesel mineral S50</b>			
<b>Concentração real</b>	<b>Concentração calculada</b>	<b>Erro absoluto</b>	<b>Erro relativo (%)</b>
3	3,1	0,1	3,2
5	5,2	0,2	3,2
10	10,5	0,5	4,7
20	20,1	0,1	0,53
<b>BXX biodiesel de óleo de girassol em diesel mineral S500</b>			
3	3,2	0,2	5,0
5	4,9	-0,1	-2,9
10	10,5	0,5	4,8
20	20,8	0,7	3,6
<b>BXX biodiesel de óleo de girassol em diesel mineral S1800</b>			
3	2,9	-0,01	-0,4
5	5,1	0,06	1,3
10	9,6	-0,4	-4,0
20	21,0	1,0	5,1

Os gráficos das concentrações calculadas frente as concentrações de referencia foram plotadas e os coeficiente de correlação foram de 0,9999, 0,9999 e 0,9969 respectivamente.

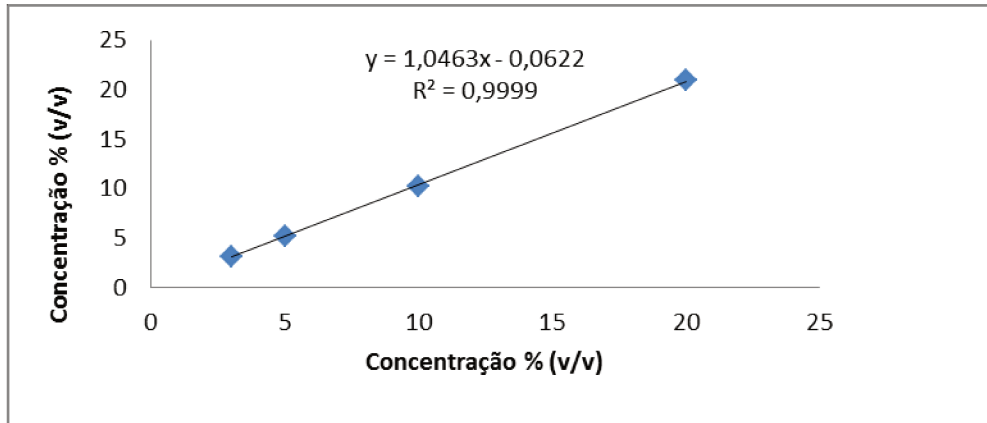


Figura 49. Concentração de biodiesel de girassol em diesel S50 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

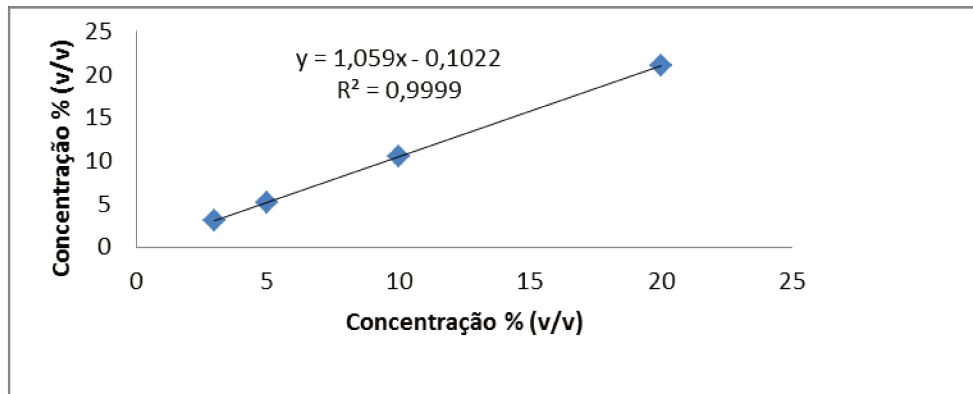


Figura 50. Concentração de biodiesel de girassol em diesel S500 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

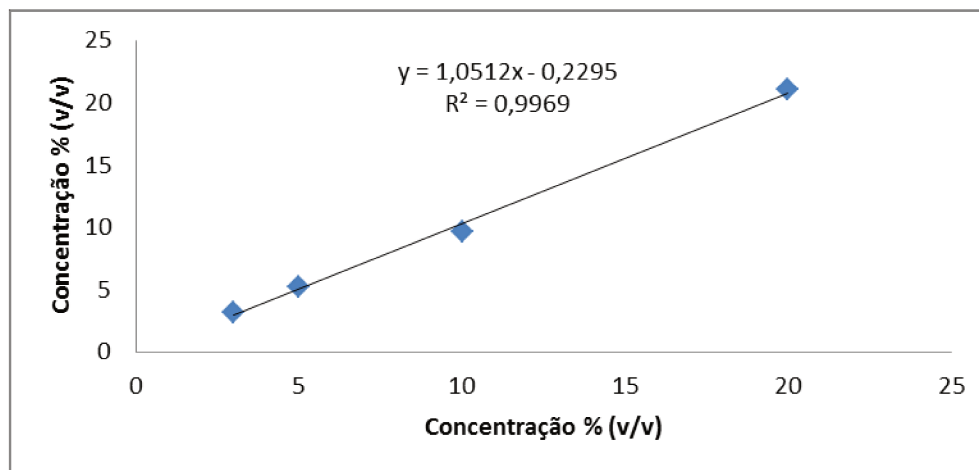


Figura 51. Concentração de biodiesel de girassol em diesel S1800 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

Os erros RMSPD e RMSEP para cada mistura BXX nos diferentes diesel minerais são mostrados na tabela 12.

**Tabela 12. Valores de RMSD e RMSE para cada mistura BXX biodiesel de milho em diesel mineral para diversas concentrações de enxofre.**

<b>Mistura BXX de biodiesel de girassol em diesel mineral S50</b>	
<b>RMSPD</b>	<b>RMSEP</b>
3,25 %	0,27 %
<b>Mistura BXX de biodiesel de girassol em diesel mineral S500</b>	
4,14 %	0,55 %
<b>Mistura BXX de biodiesel de girassol em diesel mineral S1800</b>	
3,33 %	0,53 %

Os erros quadráticos e os valores calculados pelo modelo para biodiesel de óleo de girassol é bastante parecido com o de biodiesel de óleo de milho. Isto pode ser devido aos que os compostos existentes nos dois os quais são os mesmos e o tratamento aplicado é idêntico.

A tabela13 mostra as concentrações calculadas para os biodieseis de óleo de canola e os erros absoluto e relativos para cada amostra na validação.

**Tabela 13. Concentrações calculadas e reais de biodiesel de canola em diesel mineral para a validação da curva obtida. Valores em % (v / v), erros absolutos e erro relativo em (% , v / v)**

<b>BXX biodiesel de canola em diesel mineral S50</b>			
<b>Concentração real</b>	<b>Concentração calculada</b>	<b>Erro absoluto</b>	<b>Erro relativo (%)</b>
3	3,1	0,1	4,2
5	5,2	0,2	4,1
10	10,3	0,3	2,7
20	20,9	0,9	4,6
<b>BXX biodiesel de canola em diesel mineral S500</b>			
3	3,1	0,1	4,6
5	5,1	0,1	2,0
10	10,5	0,5	5,2
20	21,1	1,1	5,4
<b>BXX biodiesel de canola em diesel mineral S1800</b>			
3	3,1	0,1	4,3
5	5,2	0,26	4,8
10	9,6	-0,4	-3,8
20	21,0	1,0	5,2

Os gráficos das concentrações calculadas frente às concentrações de referencia foram plotadas e os coeficientes de correlação foram de 0,9999, 0,9999 e 0,9969 respectivamente.

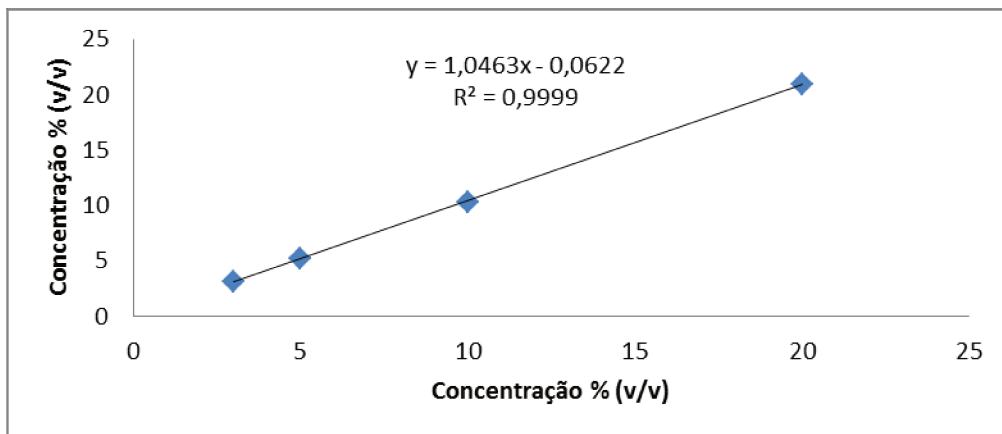


Figura 52. Concentração de biodiesel de óleo de canola em diesel S50 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

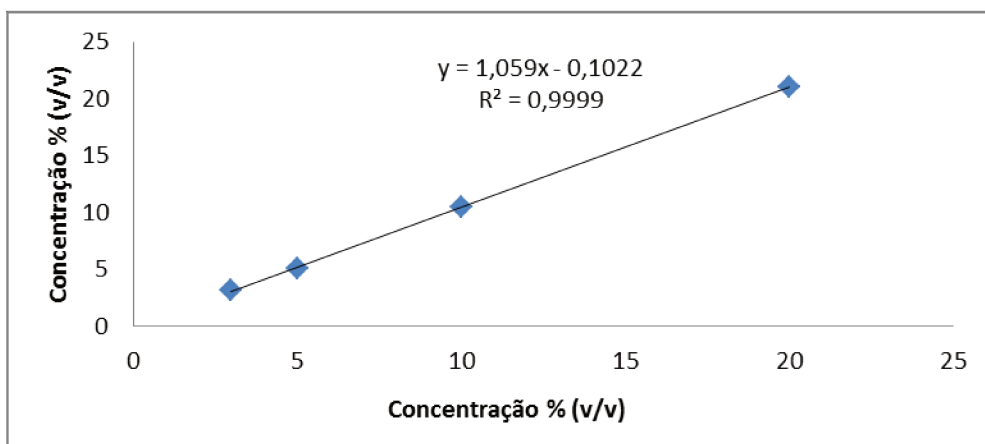


Figura 53. Concentração de biodiesel de óleo de canola em diesel S500 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

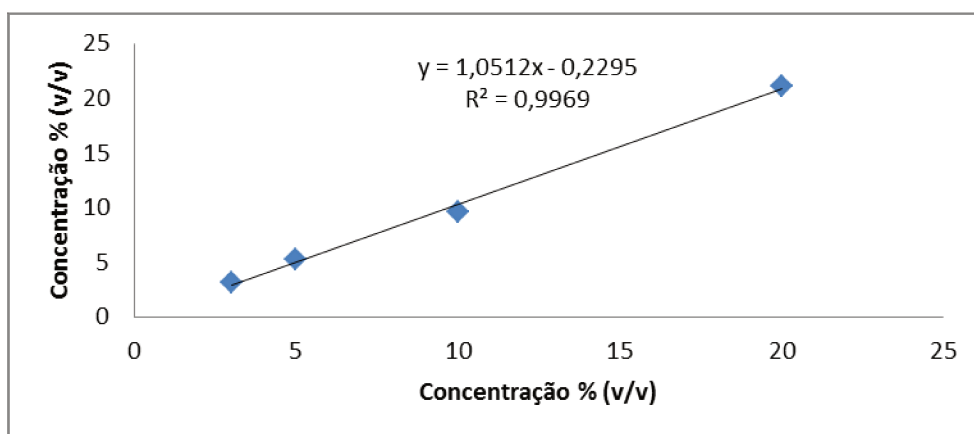


Figura 54. Concentração de biodiesel de óleo de canola em diesel S1800 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

Os erros RMSPD e RMSEP para cada mistura BXX nos diferentes dieséis minerais são mostrados na tabela 14.

**Tabela 14. Valores de RMSD e RMSEP para cada mistura BXX biodiesel de canola em diesel mineral para diversas concentrações de enxofre.**

<b>Mistura BXX biodiesel de canola em diesel mineral S50</b>	
<b>RMSPD</b>	<b>RMSEP</b>
3,98 %	0,48 %
<b>Mistura BXX de biodiesel de canola em diesel mineral S500</b>	
4,44 %	0,60 %
<b>Mistura BXX biodiesel de canola em diesel mineral S1800</b>	
4,56 %	0,57 %

Por último, foi avaliada a robustez do algoritmo com uma mistura BXX realizada com biodiesel de óleo de soja, de óleo de canola, óleo de girassol e de óleo de milho misturados.

A tabela 15 mostra as concentrações calculadas para os biodieseis misturados o erro absoluto e percentagem de erro relativo para cada amostra na validação.



**Tabela 15.**Concentrações calculadas e reais de biodiesel misto em diesel mineral para a validação da curva obtida. Valores em % (v / v), erros absolutos e erro relativo em (% , v / v).

<b>BXX biodiesel misto em diesel mineral S50</b>			
<b>Concentração real</b>	<b>Concentração calculada</b>	<b>Erro absoluto</b>	<b>Erro relativo (%)</b>
3	3,2	0,2	5,2
5	5,3	0,3	5,3
10	10,4	0,4	3,7
20	20,3	0,3	1,4
<b>BXX biodiesel misto em diesel mineral S500</b>			
3	3,1	0,1	3,5
5	4,7	-0,2	-4,9
10	10,5	0,5	5,1
20	20,6	0,6	3,2
<b>BXX biodiesel misto em diesel mineral S1800</b>			
3	3,1	0,1	4,9
5	5,3	0,3	5,1
10	10,3	0,3	2,8
20	20,9	0,9	4,7

Os gráficos das concentrações calculadas frente às concentrações de referência foram plotadas e os coeficiente de correlação foram de 0,9999, 0,9991 e 0,9999 respectivamente.

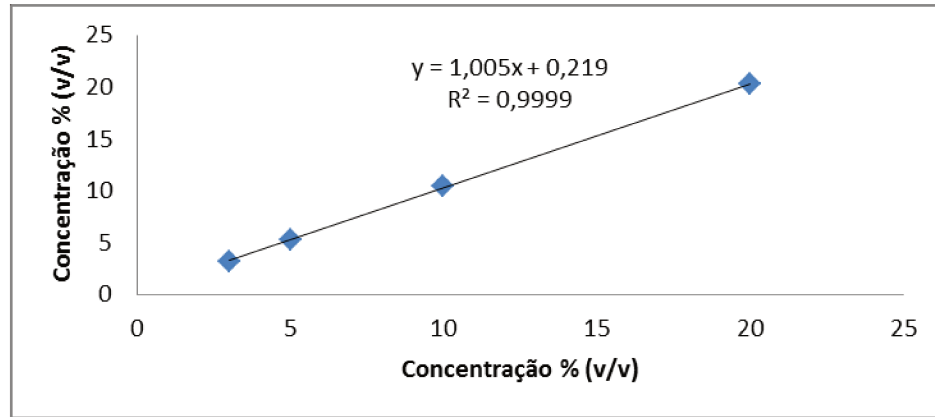


Figura 55. Concentração de biodiesel misto em diesel S50 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

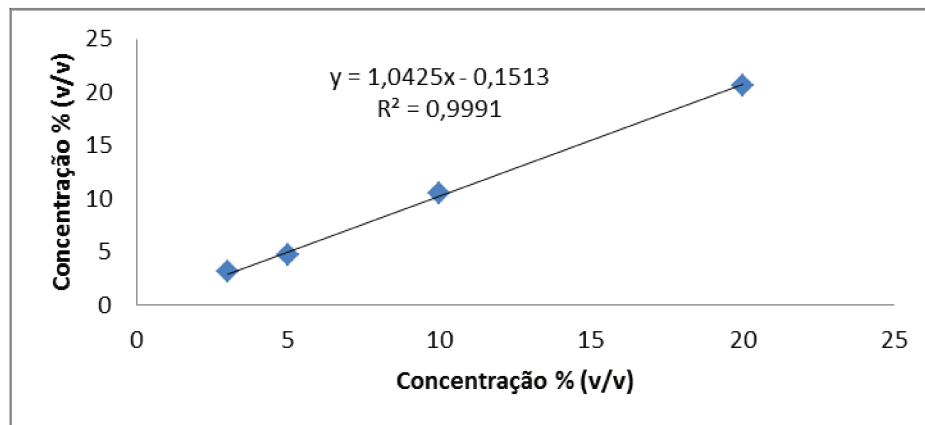


Figura 56. Concentração de biodiesel misto em diesel S500 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

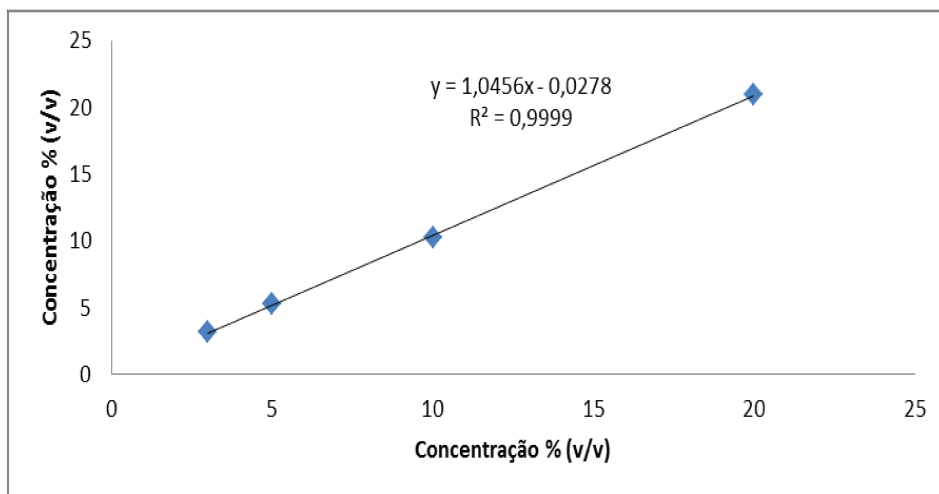


Figura 57. Concentração de biodiesel misto em diesel S1800 versus concentrações calculadas pelo MCR-ALS para validação (% , v/v).

**Tabela 16. Valores de RMSD e RMSEP para cada mistura BXX biodiesel misturado em diesel mineral para diversas concentrações de enxofre.**

<b>Mistura BXX de biodiesel misto em diesel mineral S50</b>	
<b>RMSPD</b>	<b>RMSEP</b>
4,97 %	0,31 %
<b>Mistura BXX de biodiesel misto em diesel mineral S500</b>	
4,50 %	0,42 %
<b>Mistura BXX de biodiesel misto em diesel mineral S1800</b>	
4,36 %	0,5 %

O MCR-ALS é uma excelente alternativa para quantificar amostras complexas. Este algoritmo é capaz de trabalhar com dados obtidos por GC×GC. Combinando as vantagens da alta detectabilidade e seletividade da técnica bidimensional com as características do MCR-ALS, consegue-se a quantificação das misturas BXX com biodieseis feitas das diversas matérias primas estudadas apenas com uma curva de calibração analítica única construída com biodiesel de óleo de soja, fornecendo erros absolutos ao redor de 5 % ainda quando eram interpolados dados de biodiesel de outras fontes. Além disto, os perfis recuperados dos componentes puros foram bastante similares aos obtidos por GC×GC demonstrando-se que foram resolvidas as curvas tanto do biodiesel como do diesel mineral.

# Capítulo 6: CONCLUSÕES



## 6. Conclusões

O método de preparo de biodiesel miniaturizado por ultrassom foi ideal para todo o tratamento quimiométrico realizado. O número de amostras preparadas foi maior em um tempo menor. Os ésteres metílicos de ácidos graxos minoritários, provenientes dos biodieseis foram identificados, no entanto, observou-se a baixa disponibilidade de índices de retenção e espectros de massas para a comparação. Em muitas ocasiões foi aproveitada a estruturação criada nos cromatogramas para identificar alguns compostos.

Os biodieseis de origem vegetal contêm compostos altamente insaturados. Para obter uma melhor distinção entre biodieseis de diversas fontes é necessário que a resolução dos compostos seja alta, a qual aumenta consideravelmente quando o conjunto de coluna é constituído por uma <sup>1</sup>D apolar e uma <sup>2</sup>D altamente polar. Neste caso o conjunto de coluna que resultou em uma melhor resolução foi HP-5-SIB-IL61. Assim, a resolução dos compostos insaturados foi melhorada.

Observou-se que compostos minoritários como C11:0, C12:0, C20:3n-6, C15:1n-3, C20:5n-3, C20:4n-6, C20:3n-3, C22:1n-9, C23:1n-9, C24:1n-9 nos diversos biodieseis têm importância na hora de classificá-los. A maioria deles é altamente insaturados e dificilmente detectadas pela cromatografia convencional. Neste caso os mesmos conseguiram ser detectado graças à alta capacidade de separação e detectabilidade do GC×GC.

Conseguiu-se quantificar misturas BXX com biodieseis das amostras testadas só com um algoritmo para cada tipo de diesel mineral. O algoritmo foi criado tomando-se as partes dos cromatogramas que eram iguais para cada biodiesel. Para diesel mineral S50, a equação da curva foi  $y = 0,0097x - 0,0228$ , com um coeficiente de correlação de 0,9972. Para diesel mineral S500 a equação da curva foi  $y = 0,0082x - 0,0099$ , com um coeficiente de correlação de 0,9975 e finalmente para diesel S1800, a equação da curva foi  $y = 0,0057x + 0,0172$ , com um coeficiente de correlação de 0,9970.

Os erros quadráticos para a previsão não foram maiores que 0,60 %, mas observou-se que o erro aumenta com a complexidade da amostra de diesel, isto é, com o aumento da concentração de enxofre no diesel.

***Perspectivas futuras:***

A substituição do combustível por biocombustível (biodiesel) demandara uma maior percentagem de biodiesel no diesel, outro aspecto seria o uso de um diesel mais pesado (maior percentagem de enxofre e outros heteroátomos), com isto aumentara a complexidade da amostra sendo possivelmente necessário o uso de outras ferramentas quimiométricas como PARAFAC para deconvolução de picos, assim como também outras otimizações no GC×GC (conjunto de colunas, período de modulação, entre outras).

Seria interessante um acoplamento extra como GC-RMN para melhorar a identificação dos compostos, e assim, a biblioteca de dados do grupo de pesquisa.

Capítulo 7:  
**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**





## 7. Bibliográficas

- [1] A.B.Chhetri, M.R Islam, *Energy Source A Recov. Util. Environ. Effects* 30 (2008) 754.
- [2] Brasil: Lei nº 11.097 (“Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira). DOU, 13/1/2005.
- [3] Brasil. Agência Nacional de Petróleo: Resolução ANP nº 7 de 19.3.2008. DOU, 20/3/2008.
- [4] Brasil. Agência Nacional de Petróleo: Resolução ANP 37 de 22.12.2005. DOU, 23/12/2008.
- [5] S Braun, S.G Appell, M Schmal, *Quim Nova*, 27 (2004) 472.
- [6] Ma, F.M. A Hanna, *Bioresour Technol*, 70 (1999) 15.
- [7] L.F Paulillo, C.E.F. Vian, *Rev Econ Sociol Rural*, 45 (2007) 531.
- [8] M Beauchaine, *Am. Lab*, 39(2007) 16.
- [9] M.F.Pimentel, G.M.G.S.Ribeiro, *Microchem J*, 82 (2006) 201.
- [10] F.C.C.Oliveira, C.R.R.Brandão, *Anal Chim Acta*, 587 (2007) 194.
- [11] I.Eide, K Zahlsen, *Energ. Fuels*, 21(2007) 3702.
- [12] C.M.Reddy, Demello, *EnvSciTechnol*, 42 (2008) 2476.
- [13] R.C.M.Faria, M.J.C Rezende, *Quim Nova*, 30 (2007) 1900.
- [14] T.A.Foglia, K.C.Jones, *Chromatographia*, 62 (2005) 115.
- [15] Comitê Europeu para Padronização: Norma EN14331 (“Liquid Petroleum Products Separation and Characterization of Fatty Acid Methyl Esters (FAME) From Middle Distillate Fuels”). Bruxelas 2004.
- [16] C.Ragonesea, P. Quinto, *J Chromatogr A*, 1216 (2009) 8997.
- [17] Z.Liu, J.B.Phillips, *J Chromatogr Sci*, 29 (1991) 227.
- [18] J. C. Giddings, *Anal Chem*, 56 (1984) 1258A.
- [19] J.Dallüge, J. Beens, *J Chromatogr A*, 1000(2003) 69.
- [20] L. W. Hantao, “Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente: Aplicações em Lipidômica” Dissertação de mestrado, 2011.
- [21] F.Adam, F.Bertoncini, *J Chromatogr A*, 1186 (2007) 236.
- [22] J.V.Seeley, S.K.Seeley, *J Chromatogr Sci*, 45 (2007) 650.
- [23] K.M.Pierce, J.C.Hoggard, *J Chromatogr A*, 1184 (2008) 341.
- [24] A.C. Pinto, L.L.N. Guarieiro, *J BrazChem Soc*, 16 (2005) 1313.
- [25] A Murungesan, C Umarani, *Renew Sustain Energy Rev*, 13 (2009) 834.
- [26] National Biodiesel Board, 2007d. *Biodiesel emissions*. <[http://www.biodiesel.org/pdf\\_files/fuelfactsheets/emissions.pdf](http://www.biodiesel.org/pdf_files/fuelfactsheets/emissions.pdf)>.
- [27] L. J.Rosenblum. Feasibility of Biodiesel for rural electrification in India (*Draft*) June (2000).
- [28] A.K.Agarwal, *TIRE Inf Dig Ener (TIDE)*, 8 (1988) 203.
- [29] P Felizardo, M Joana, *Mgmt*, 26 (2006) 494.
- [30] L Meher, D Vidva Sagar, *Renew Sustain Energy Rev*, 10 (2006) 268.
- [31] R Lima, R Da Silva, *Quim Nova*, 30 (2007) 603.
- [32] SKeera, A R Taman, *Fuel*, 90(2011) 47
- [33] V. Gerpen, *Fuel Process Technol*, 86 (2005) 1107.
- [34] Ma. Hanna, *Bioresour Technol*, 70 (1999) 15.
- [35] R. Alcantara, *J Biomass Bioenergy*, 18 (2000) 527.
- [36] M.W. Formo, *J Am Oil Chem Soc*, 11(1954) 59.

- [37] U. Schuchardt, R. Sercheli, *J Bral Chem Soc*, 9 (1998) 210.
- [38] P. Nakpong, S Wootthinkanokkan, *Renew Energy*, 35 (2010) 1687.
- [39] M. Zabeti, W. M. A Wan Daud, *Fuel Process Technol*, 90 (2009) 777.
- [40] C. Samart, C Chaiya, *Energy Convers Manage* 51 (2010) 1431.
- [41] A.V. Tomasevic, S.S Marinkovic, *Fuel Process Technol*, 83 (2003) 6.
- [42] G. Kafuku, M. Mbarawa, *Applied Energy*, 87(2010) 2565.
- [43] B. Freedman, E. H Pryde, *J Am Oil Chem Soc*, 61 (1984) 1643.
- [44] Y. Zhang, M.A Dube, *Bioresur Technol*, 90 (2003) 240.
- [45] R.U Feuge, A Gros, *J Am Oil Chem Soc*, 26 (1949) 97.
- [46] X. Meng, G. Wang, *Fuel Process Technol*, 89 (2009) 7.
- [47] G. Knothe, V. Gerpen, *The biodiesel handbook*, AOCS Press CRC Press (2005)  
286
- [48] A Demirbas, *Biodiesel: a realistic fuel alternative for diesel engines*, Springer Verlag, (2008) 2794
- [49] A. Murugesan, T.R. Chinnusay, *International Conference on Engines and Combustion. Dec 6-9 (2007)* 576.
- [50] J. Hernando, P. Leton, *Fuel*, 86 (2006) 4.
- [51] Q. D Rocha, K. Barros, *Quim Nova*, 31 (2008) 1066.
- [52] M. Pimentel, F. Ribeiro, *MicrochemJ*, 82 (2006) 201.
- [53] A. Holanda, *Câmara dos Deputados Federais: Brasília, DF*, (2004).
- [54] *Anuário Brasileiro de Soja, Ed. Gazeta G.C. Santa Cruz do Sul: RS(2001)*
- [55] W. Yuan, A.C Hansen, *Fuel*, 84 (2005) 943.
- [56] J Hernando, P Leton, *Fuel*, 86 (2006) 4.
- [57] M. Avramović, S. Olivera, *Fuel Process Technol*, 91 (2010) 1557.
- [58] B. Omotola, P. Leslie, *Technol Energies*, 3 (2009) 1703.
- [59] L. Thanh, K. Okitsu, *Proc Symp Ultrassom Electron*, 29 (2008) 396.
- [60] C. M. Hsiao, L Chiuan-Chin, *Fuel*, 89 (2010) 3622.
- [61] L. Thanh, K. Okitsu, *Bioresour Technol*, 101 (2010) 645.
- [62] I.L Lucena, G.F Fernandes, *Ind Eng Chem Res*, 47 (2008) 6889.
- [63] H. Chien Ming, L. Chin-Chiuan, *Fuel*, 89 (2010) 3622.
- [64] T. Mason, J Lorimer Mason, *The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, (2002).
- [65] R Gardner, S Kazi *Toxicol Lett*, 65 (2004) 148.
- [66] G Knothe, J Krahl *The Biodiesel Handbook*, AOCS Press, Champaign, IL, (2005).
- [67] M. Mittelbach, C. Remschmidt *The Comprehensive Handbook*, Karl-Franzens-University, Graz, (2004).
- [68] A.W Schawab, M.O Bagby, *Fuel*, 66 (1987) 1378.
- [69] M. R. Monteiroa, A. Regina, P Ambrozina, *Talanta*, 77 (2008) 605.
- [70] W.T. Prapin, W. P. J. Marriott, *J Sep Sci*, 31 (2008) 2649.
- [71] European Committee for Standardization, BS EN 14103 Fat and Oil Derivatives Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Determination of Ester and Linolenic Acid Methyl Ester Contents, *BSI British Standards, London*.
- [72] G. Knothe, *J Am Oil Chem Soc*, 78 (2001) 1025.
- [73] W. W. Christie, *Gas Chromatography and Lipids*, 1<sup>st</sup> ed, The Oily Press, BridgeWater (1990).
- [74] M. Volmer, G. Meiborgand, *J Chromatogr*, 434 (1988) 385.
- [75] L.R. Alexander, J.B. Justice, *J Chromatogr*, 342 (1985) 1.
- [76] F.A.J. Muskiet, J.J. vanDoormaal, *J. Chromatogr*, 278(1983) 231.

- [77] N.C. Shantha, G.E. Napolitano, *J Chromatogr*, 624 (1992) 37.
- [78] P. Bondioli, A. Lanzani, *Rivital Sostanze Grasse*, 71 (1994) 287.
- [79] P. Bondioli, L. DellaBella, *Rivital Sostanze Grasse*, 80 (2003) 173.
- [80] D. Guo, M. Sheng, S. Luo *Zhongguo Youzhi*, 29 (2004) 44.
- [81] R. Wawrzyniak, W. Wasiak, *Chem Pap*, 59 (2005) 449.
- [82] U. Rashid F. Anwar, *Fuel Process Technol*, 90 (2009) 1163.
- [83] L.R. Alexander, J.B. Justice, *J Chromatogr*, 342 (1985) 1.
- [84] S. Schober, I. Seidl, *J Lipid Sci Technol*, 108 (2006) 309
- [85] K Eder, *J Chromatogr B*, 671 (1995) 131.
- [86] P. Nakpong, S. Wootthikanokkhan, *Renew Energy*, 35 (2010) 1687.
- [87] J.B. Beens COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY The state-of-separation-arts (2009).
- [88] M. G. Perez, T. Adams, *Energy Fuels*, 21 (2007) 2372.
- [89] A. N. Dias, M. B. R. Cerqueira, *Fuel*, 94 (2012) 183.
- [90] H. Zhang, Q. Shang, *China Oils Fats*, 33 (2008) 52.
- [91] UNIEN 14331 Liquid Petroleum Products—Separation and Characterization of Fatty Acid Methyl Esters (FAME) in Middle Distillate Fuels; European Committee for Standardization: Management Centre, rue de Stassart 36, B 1050 Bruxelles, (2004).
- [92] C.J. Venkatramani, J.Z. Xu, J.B. Phillips, *Anal Chem*, 68 (1996) 1486.
- [93] J.M. Davis, J.C. Giddings, *Anal Chem*, 55 (1983) 418.
- [94] D. Ryan, P. Morrison, P. Marriott, *J Chromatogr A*, 1071 (2005) 53.
- [95] J.C. Giddings, *J Chromatogr A*, 703 (1995) 3.
- [96] A.L. Lee, C.A. Lewis, *J Microcol Sep*, 12 (2000) 187.
- [97] C. Abrukner, B. J. Prazen, R. E. Synovec, *Anal Chem*, 70 (1998) 2796.
- [98] P. J. Marriot, R. M. Kinghorn, *Anal Chem*, 69 (1997) 2582.
- [99] E. B. Ledford, C. Billesbach, *J High Resol Chromatogr*, 23 (2000) 202.
- [100] T. C. Tran, A. Graham, *Geochim Cosmochim Acta*, 74 (2010) 6484.
- [101] M.P. Pedroso, L. A. F., *Quim Nova*, 32 (2009) 430,
- [102] M. Silvana, A. Moraes, *Quim Nova*, 34 (2011) 1192.
- [103] R.L. Grob, *Modern Practice of Gas Chromatography*, 3<sup>ed</sup> ed., Wiley, New York, (1995)
- [104] F.E. Adama, F. Bertocini, *J Chromatogr A*, 1186 (2008) 244.
- [105] L. Mondello, A. Casilli, *J Sep Sci*, 27 (2004) 442.
- [106] K. M. Pierce, J. C. Hoggard, *J Chromatogr A*, 1184 (2008) 352.
- [107] K.M. Pierce, L.F. Wood, *Anal Chem*, 77 (2005) 7735.
- [108] X. Lu, J. Cai, H. Kong, *Anal Chem*, 75 (2003) 4441.
- [109] C.G. Fraga, B.J. Prazen, R.E. Synovec, *Anal Chem*, 72 (2000) 4154
- [110] B.R. Kowalski, *J Chem Inf Comput Sci*, 15 (1975) 201.
- [111] K.J. Johnson, B.J. Prazen, *J Sep Sci*, 27 (2004) 410.
- [112] V.G.V. Mispelaar, A.K. Smilde, *J Chromatogr A*, 1096 (2005) 156.
- [113] S. Wold, P. Geladi, K. Esbensen, *J Chemom*, 1 (1987) 41.
- [114] R.B. Gaines, G.J. Hall, *Environ Forensics*, 7 (2006) 77.
- [115] K.J. Johnson, R.E. Synovec, *Chemom Intell Lab Sys*, 60 (2002) 225.
- [116] K.M. Pierce, J.L. Hope, *Talanta*, 70 (2006) 797.
- [117] R.A. Shellie, W. Welthagen, *J Chromatogr A*, 1086 (2005) 83.
- [118] G. T. Ventura, J. Gregory, *J Chromatogr A*, 1218 (2011) 2592.

- [119] H.M.Mc Nair, J.M Miller, Basic Gas chromatography, 2<sup>nd</sup> ed, John Wiley & Sons, new Jersey, 2009.
- [120] R. Tauler, *Chemom Intell Lab Syst*, 30 (1995) 146.
- [121] C. Debonneville, A Chaintreau, *J Chromatogr A*, 1027 (2004) 109.
- [122] Z.D. Zeng, Y.Z. Liang, *Talanta*, 74 (2008) 1568.
- [123] R. Tauler, D. Barcelo, *EnvironSci Technol*, 34(2000) 3314.
- [124] L. A. F. de Godoy, L. W. Hantao, *Anal Chim Acta*, 699 (2011) 125.
- [125] D. W. Lachenmeier, W. Altraud, *J Agric Food Chem*, 56 (2008) 5468.
- [126] T. Azzouz, R. Tauler, *Talanta*, 74 (2008) 1210.
- [127] R. Tauler, mcr\_als2009, (<http://www.cid.csic.es/homes/rtaqam/>).Programs and utilities (MATLAB) (2009).