



# **Desenvolvimento de método por cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal para determinação do teor de biodiesel no óleo diesel e de adulteração por óleos vegetais**

**Taís Santana de Matos**

**Projeto Final de Curso em Engenharia Química**

**Orientadores:**

Cristiane Gimenes de Souza(LABCOM-EQ-UFRJ), M.Sc

Débora França de Andrade (DQA-IQ-UFRJ),D.Sc

Luiz Antonio d'Avila (DPO-EQ-UFRJ), D.Sc

Maio de 2018

# DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE NORMAL PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BIODIESEL NO ÓLEO DIESEL E DE ADULTERAÇÃO POR ÓLEOS VEGETAIS

*Taís Santana de Matos*

Projeto de Final de Curso em engenharia química submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado em:

---

Amaro Gomes Barreto Jr, D.Sc

---

Fernanda Veronesi Marinho Pontes, D.Sc

---

Rafael Cavalcante dos Santos, M.Sc

Orientadores:

---

Cristiane Gimenes de Souza, M.Sc

---

Débora França de Andrade, D.Sc

---

Luiz Antonio d'Avila, D.Sc

Rio de Janeiro, RJ- Brasil

Maio de 2018

Matos, Taís S.

Desenvolvimento de método por cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal para determinação do teor de biodiesel no óleo diesel e de adulteração por óleos vegetais. / Taís Santana de Matos, Rio de Janeiro, UFRJ/EQ, 2018

Xvii, 83p.; il.

Monografia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2018

Orientadores: Cristiane Gimenes de Souza e Débora França de Andrade e Luiz Antonio d'Avila.

1. Adulteração 2. Biodiesel 3. CLAE-FN 4. Monografia (Graduação-UFRJ/EQ) 5. Cristiane Gimenes de Souza e Débora França de Andrade e Luiz Antonio d'Avila. I. Desenvolvimento de método por cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal para determinação do teor de biodiesel no óleo diesel e de adulteração por óleos vegetais.

**“Faça todo o bem que você puder, com todos os recursos que você puder, por todos os meios que você puder, em todos os lugares que você puder, em todos os tempos que você puder, para todas as pessoas que você puder, sempre e quando você puder.”**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por dar sentido a minha vida. Todas as coisas são dEle, por Ele e para Ele.

Aos meus orientadores Luiz Antonio d'Avila cuja mente brilhante me ajudou durante o processo de idealização e execução deste projeto, a Cristiane Gimenez de Souza e Débora França de Andrade por toda a paciência, ajuda e apoio para a execução desse projeto, sem vocês nada disso seria possível.

A toda a minha família e amigos, em especial a, meus pais Rozilene e Agnaldo Matos, meu irmão Caio Matos, minha avó Risalva e meus amigos Laís Cunha e Luiz Fellipe Menezes que foram que mais sofreram e me ajudaram com todas as dificuldades enfrentadas ao longo da graduação. Essa conquista também é de vocês.

Aos companheiros de laboratório e amigos do LABCOM em especial a Gabriella, Mayara, Rafael, Renan, Renato e Roberta por todas as incontáveis contribuições a esse trabalho mas também por toda as conversas e risadas que tornaram essa caminhada mais leve.

Ao CNPq pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro.

A todos que participaram de forma direta ou indiretamente deste trabalho.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Químico.

## **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE NORMAL PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BIODIESEL NO ÓLEO DIESEL E DE ADULTERAÇÃO POR ÓLEOS VEGETAIS**

Taís Santana de Matos

Maio,2018

Orientadores: Mrs. Cristiane Gimenez de Souza; Dra. Débora França de Andrade; Dr. Luiz Antonio d'Avila.

Com o aumento da importância do biodiesel na matriz energética brasileira, a partir de sua inclusão no óleo diesel comercializado no país, surge a necessidade de se monitorar a qualidade do biodiesel produzido e distribuído nos postos de abastecimento e verificar a existência de possíveis adulterações no óleo diesel comercializado. A adulteração de misturas biodiesel:óleo diesel com óleo vegetal é a mais passível de ser adotada, pois o óleo vegetal apresenta boa miscibilidade no óleo diesel e no biodiesel, além de possuir um valor de mercado inferior ao do biodiesel e possibilitar que o combustível adulterado atenda às especificações vigentes e ainda não seja detectado pelo método analítico de referência, que se baseia na espectroscopia na região do infravermelho (EN 14078), adotado pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Desta forma, este trabalho visa empregar a cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal (CLAE-FN), com detector de índice de refração, para a quantificação do teor de biodiesel no óleo diesel e detecção de adulterações de misturas biodiesel:óleo diesel com óleo vegetal. Foram analisadas 23 amostras da mistura óleo diesel:biodiesel:óleo vegetal para a construção de duas curvas analíticas x concentração. A partir dessas curvas analíticas foram analisadas 12 amostras de verificação (amostras preparadas em concentrações distintas das curvas analíticas) e 20 amostras comerciais(amostras provenientes de postos revendedores de combustível). O método proposto mostrou bom desempenho analítico em termos de linearidade, precisão (repetibilidade), exatidão (recuperação) , limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. O método apresentou boa linearidade para a concentração de biodiesel e óleo vegetal em óleo diesel variando de 5 a 30% volumétrica ( $R^2=0,9968$  e  $R^2=0,9962$ , respectivamente) e de 4 a 12% volumétrica ( $R^2=0,9924$  e  $R^2=0,9950$ , respectivamente). Os valores de LD e LQ encontrados para o biodiesel foram de 0,08 e 0,23 %volumétrica, respectivamente. Os valores de LD e LQ encontrados para o óleo vegetal foram de 0,07 e 0,21 % volumétrica, respectivamente. Os valores de recuperação variam de 97,7% a 107,0% indicando uma boa exatidão e o método se mostrou robusto quando houve variação de temperatura de 40°C para 35°C. O teste t pareado mostrou que não existe diferença significativa, com 95% de confiança, entre o método proposto e o de referência, mostrando a capacidade da CLAE-FN de detectar e quantificar o biodiesel contido na amostra além de detectar as possíveis adulterações com óleos vegetais de maneira rápida e eficaz, demonstrando assim sua importância no controle de qualidade deste combustível, uma vez que a metodologia vigente pela ANP (EN 14078), não é capaz de identificar tais adulterações.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF NORMAL PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR DETERMINATION OF BIODIESEL CONTENT IN DIESEL OIL AND ADULTERATION BY VEGETABLE OILS

With the increasing importance of biodiesel in the Brazilian energy grid, due to its inclusion in diesel oil marketed in the country, the need to monitor the quality of the biodiesel produced and distributed at the filling stations arises. In this scenario, it's important to verify the existence of possible adulterations in the oil diesel commercialized too. The adulteration of biodiesel blends: diesel oil with vegetable oil is the most likely to be adopted. It happens because vegetable oil has a good miscibility in diesel oil and biodiesel and their prices are lower than biodiesel's. Moreover, the adulteration with vegetable oils in the biodiesel:diesel oil blend won't be detected by the reference analytical method, which is based on infrared spectroscopy (EN 14078), adopted by the National Agency for Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP). So, if someone decides to adulterate the diesel oil with vegetable oil this mix will still be considered a good sample with the biodiesel content in diesel matching the current specifications. In this way, this work aims to use the high-performance liquid chromatography in normal phase (CLAE-FN), with refractive index detector, for the quantification of biodiesel in biodiesel: diesel oil blends and the detection of adulterations of biodiesel blends: diesel oil with vegetable oil. We analyzed 23 samples of the diesel oil: biodiesel: vegetal oil mixture for the construction of two analytical curves. From these analytical curves, 12 test samples (samples prepared at different concentrations of the analytical curves) and 20 commercial samples (samples from fuel stations) were analyzed. The proposed method showed good analytical performance in terms of linearity, precision (repeatability), accuracy (recovery), limit of detection (LD), limit of quantification (LQ) and robustness. CLAE showed good linearity for the concentration of biodiesel and vegetable oil in diesel oil ranging from 5 to 30% volumetric ( $R^2 = 0.9968$  and  $R^2 = 0.9962$ , respectively) and from 4 to 12% volumetric ( $R^2 = 0.9924$  and  $R^2 = 0.9950$ , respectively). The values of LD and LQ found for biodiesel were 0.08 and 0.23% volumetric, respectively. The values of LD and LQ found for vegetable oil were 0.07 and 0.21% volumetric, respectively. Recovery values range from 97.7% to 107.0% indicating good accuracy and the method was robust when there was a temperature change from 40°C to 35°C. The paired t-test showed that there is no significant difference, with 95% confidence, between the proposed method and the reference method, showing the ability of the HPLC-FN to detect and quantify the biodiesel contained in the sample, besides detecting possible adulterations with oils vegetables in a fast and efficient way, demonstrating its importance in the quality control of this fuel, since the methodology that ANP use to do the determination of biodiesel content in diesel oil (EN 14078) is not able to identify such adulterations.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reação de transesterificação.Os grupos R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> e R <sub>3</sub> representam as cadeias hidrocarbônicas alifáticas saturadas ou insaturadas; podendo ser iguais ou diferentes, e o grupo R <sub>4</sub> representa a cadeia do álcool utilizado.....	15
<b>Figura 2.</b> Reações consecutivas para a produção do biodiesel (ARAUJO, 2017). Os grupos R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> e R <sub>3</sub> representam as cadeias hidrocarbônicas alifáticas saturadas ou insaturadas; podendo ser iguais ou diferentes, e o grupo R representa a cadeia do álcool utilizado.....	15
<b>Figura 3.</b> Principais características não conformes para o óleo diesel em março/2017 segundo boletim das qualidades dos combustíveis de março/2018.....	18
<b>Figura 4:</b> Cromatograma, obtido por CLAE-UV, do produto de transesterificação do óleo de canola com baixa conversão (30%).....	25
<b>Figura 5.</b> Cromatogramas, obtidos por CLAE-FN, das amostras de biodiesel:óleo diesel adulteradas com óleo de soja nas concentrações de 5% a 30% volumétrica.....	43
<b>Figura 6.</b> Curva analítica da concentração do biodiesel (% volumétrica) versus área ( $\mu\text{UIR}^*\text{min}$ ), na faixa de 5 a 30% volumétrica.....	45
<b>Figura 7.</b> Curva analítica da concentração do óleo vegetal (% volumétrica) versus área ( $\mu\text{UIR}^*\text{min}$ ), na faixa de 5 a 30% volumétrica.....	46
<b>Figura 8.</b> Curva analítica da concentração do biodiesel (% volumétrica) versus área ( $\mu\text{UIR}^*\text{min}$ ), na faixa de 4 a 12% volumétrica.....	46
<b>Figura 9.</b> Curva analítica da concentração do óleo vegetal (% volumétrica) versus área ( $\mu\text{UIR}^*\text{min}$ ), na faixa de 4 a 12% volumétrica.....	47
<b>Figura 10.</b> Cromatograma, obtido por CLAE-FN, de uma amostra de biodiesel:óleo diesel proveniente de um posto revendedor de combustível da região sudeste do país.....	50

**Figura 11.** Curva analítica da concentração do óleo vegetal (% volumétrica) versus área ( $\mu\text{UIR}^*$  min), na faixa de 4 a 12% volumétrica realizada a 35°C.....63

**Figura 12.** Curva analítica da concentração do óleo vegetal (% volumétrica) versus área ( $\mu\text{UIR}^*$  min), na faixa de 4 a 12% volumétrica realizada a 35°C.....63

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição química, em ácidos graxos (% massa), de alguns óleos vegetais.....	5
<b>Tabela 2.</b> Fórmula estrutural de alguns ácidos graxos.....	7
<b>Tabela 3.</b> Composição das amostras de biodiesel:óleo diesel adulteradas com óleo de soja, referentes a primeira curva analítica.....	29
<b>Tabela 4.</b> Composição das amostras de biodiesel:óleo diesel adulteradas com óleo de soja, referentes a segunda curva analítica.....	30
<b>Tabela 5.</b> Composição das amostras de biodiesel:óleo diesel adulteradas com óleo de soja para a verificação das curvas analíticas.....	30
<b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos pelo método de referência (espectroscopia na região do IV - método EN 14078), das amostras de biodiesel:diesel adulteradas com óleo de soja, referentes a primeira curva analítica.....	39
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos pelo método de referência (espectroscopia na região do IV - método EN 14078), das amostras de verificação referentes a primeira curva analítica.....	40
<b>Tabela 8.</b> Resultados obtidos pelo método de referência (espectroscopia na região do IV método EN 14078), das amostras de verificação referentes a segunda curva analítica.....	41
<b>Tabela 9.</b> Resultados obtidos pelo método de referência (espectroscopia na região do IV método EN 14078), das amostras comerciais provenientes de postos de abastecimento.....	43
<b>Tabela 10.</b> Comparação dos resultados obtidos da análise das amostras de verificação de 1 a 6 (referentes a primeira curva analítica) por espectroscopia na região do IV - método EN 14078, e pelo método proposto (CLAE-FN).....	48
<b>Tabela 11.</b> Comparação dos resultados obtidos da análise das amostras de verificação de 7 a 12 (referentes a segunda curva analítica) por espectroscopia na região do IV, pelo método EN 14078, e pelo método proposto (CLAE-FN).....	49

<b>Tabela 12.</b> Comparação dos resultados obtidos, da análise de 10 amostras provenientes de postos de combustível por espectroscopia na região do IV (método EN 14078) e pelo método proposto, a partir da curva analítica na faixa de 5 a 30% volumétrica.....	51
<b>Tabela 13.</b> Comparação dos resultados obtidos, da análise de 10 amostras provenientes de postos de combustível por espectroscopia na região do IV (método EN 14078) e pelo método proposto, a partir da curva analítica na faixa de 4 a 12% volumétrica.....	52
<b>Tabela 14.</b> Dados dos parâmetros de Hansen dos solventes <i>n</i> -hexano, MTBE, acetona, metanol, etanol, isopropanol, THF e acetonitrila.....	53
<b>Tabela 15.</b> Dados dos parâmetros de Hansen da mistura 10%MTBE e 90% <i>n</i> -hexano em volume.....	54
<b>Tabela 16.</b> Dados dos parâmetros de Hansen da mistura Metanol em <i>n</i> -hexano.....	54
<b>Tabela 17.</b> Dados dos parâmetros de Hansen da mistura Etanol em <i>n</i> -hexano.....	55
<b>Tabela 18.</b> Dados dos parâmetros de Hansen da mistura Isopropanol em <i>n</i> -hexano.....	55
<b>Tabela 19.</b> Dados dos parâmetros de Hansen da mistura THF em <i>n</i> -hexano.....	55
<b>Tabela 20.</b> Dados dos parâmetros de Hansen da mistura Acetonitrila em <i>n</i> -hexano.....	55
<b>Tabela 21.</b> Resultados da equação da reta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), valor de Cochran calculado e tabelado das curvas analíticas.....	58
<b>Tabela 22.</b> Limite de detecção, em % volumétrica do método CLAE-FN.....	60
<b>Tabela 23.</b> Limite de quantificação, em % volumétrica, do método CLAE-FN.....	60
<b>Tabela 24.</b> Valores da recuperação (%) para o método CLAE-FN.....	61
<b>Tabela 25</b> Valores do coeficiente de variação (%) do método CLAE-FN .....	62
<b>Tabela 26.</b> Resultados da equação da reta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), valor de Cochran calculado e tabelado das curvas analíticas.....	64
<b>Tabela 27.</b> Resultados do teste t: duas amostras em par para médias, comparando os resultados obtidos das 5 concentrações diferentes das curvas analíticas realizadas na temperatura de 40°C e 35 °C.....	65

**Tabela 28.** Resultados do teste t: duas amostras em par para médias, comparando os resultados obtidos das 20 amostras comerciais provenientes de postos revendedores de combustível analisados pelo método proposto (CLAE-FN) e pelo método de referência (EN 14078).....67

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1:</b> Energia coesiva total das moléculas em função da contribuição parcial das energias (Hansen,2007).....	27
<b>Equação 2:</b> Energia total de coesão em função da energia de vaporização do líquido.....	27
<b>Equação 3:</b> Energia de vaporização (Hansen,2007).....	27
<b>Equação 4:</b> Cálculo do parâmetro de diferença de energias, onde $R_a$ é a distância calculada entre o solvente e o composto de interesse e $R_0$ é a distância máxima arbitrada (Hansen, 2007) .....	28
<b>Equação 5:</b> Cálculo da distância entre o solvente e o composto de interesse.....	28
<b>Equação 6:</b> Expressão usada para determinar o valor de $C_{\text{calculado}}$ para o teste de Cochran.....	33
<b>Equação 7.</b> Expressão usada para obtenção do valor de t calculado para o teste t-pareado.....	34
<b>Equação 8.</b> Equação da reta que relaciona a concentração conhecida e a resposta do método analítico.....	35
<b>Equação 9.</b> Expressão empregada para a determinação do limite de detecção (LD) do método analítico.....	36
<b>Equação 10.</b> Expressão empregada para a determinação do limite de quantificação (LQ)do método analítico.....	36
<b>Equação 11.</b> Expressão empregada para a determinação da recuperação do método analítico.....	37
<b>Equação 12:</b> Expressão empregada para a determinação do coeficiente de variação (CV) do método analítico.....	37

## LISTA DE SIGLAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	Sociedade Americana para Testes e Materiais ( <i>American Society for Testing and Materials</i> )
ATR	Reflexão total atenuada
BX	Mistura de óleo diesel com X% de biodiesel
B100	Biodiesel puro
C18	Grupo octadecilsilano
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
CV	Coeficiente de variação
DAG	Diacilgliceóis
DEEL	Detector evaporativo de espalhamento de luz
DOU	Diário Oficial da União
EN	Norma Européia
FR	Fase Reversa
FRNA	Fase Reversa Não Aquosa
FT	Transformada de Fourier
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
FTNIR	Espectroscopia de Infravermelho próximo com Transformada de Fourier
iPLS	Regressão por mínimos quadrados parciais por intervalo
IV	Infra Vermelho
LABCOM	Laboratório de Combustíveis e Derivados de Petróleo da EQ/UFRJ
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação

MIR	Espectrometria na região do infravermelho médio
MLR	Regressão linear múltipla
NBR	Norma Brasileira
NC	Número de Carbonos
NIR	Região do Infravermelho próximo
NLD	Número de Ligações Duplas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Regressão por componentes principais
PLS	Mínimos Quadrados Parciais
PTFE	Politetrafluoretileno
RMSEC	Erros quadráticos médios de calibração
RMSEP	Erros quadráticos médios de produção
SPA	Algoritmo das projeções sucessivas
TAG	Triacilgliceróis
$t_R$	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
2. Objetivo.....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. Revisão Bibliográfica.....	4
3.1 Os óleos vegetais.....	4
3.2 O biodiesel.....	8
3.3 A produção do biodiesel.....	14
3.4 A qualidade do biodiesel.....	16
3.5 Os métodos para a determinação do teor de biodiesel no óleo diesel e para a identificação de possíveis adulterações.....	18
3.5.1 A espectroscopia na região do infravermelho.....	18
3.5.2 A cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.....	23
3.6 A Teoria de Hansen.....	26
4. Material e Métodos.....	29
4.1 O biodiesel B100, o óleo vegetal e o óleo diesel.....	29
4.2 O preparo das amostras ternárias de óleo diesel, biodiesel e óleo vegetal.....	29
4.3 As análises das amostras pelo método de referência (espectroscopia na região do IV – método EN14078) .....	31
4.4 As análises das amostras pelo método proposto (cromatografia líquida de alta eficiência) .....	32
4.5 A seleção de novas fases móveis a serem empregadas na CLAE-FN-IR utilizando a teoria de Hansen.....	32
4.6 O tratamento estatístico.....	32
4.6.1 O teste de Cochran.....	32
4.6.2 O teste t-pareado.....	33
4.7 A validação do método.....	34
4.7.1 A avaliação da linearidade do método.....	35
4.7.2 A avaliação do limite de detecção (LD).....	36
4.7.3 A avaliação do limite de quantificação (LQ).....	36
4.7.4 A avaliação da exatidão.....	36
4.7.5 A avaliação da precisão.....	37
4.7.6 A avaliação da robustez.....	38

5. Resultados e Discussão.....	38
5.1 A análise das amostras pelo método de referência (espectroscopia na região do IV – método EM 14078) .....	38
5.2 A análise das amostras pelo método proposto (cromatografia líquida de alta eficiência) .....	43
5.2.1 A análise das amostras padrão (construção da primeira curva analítica) .....	44
5.2.2 A análise das amostras padrão (construção da segunda curva analítica) .....	46
5.2.3 A análise das amostras de verificação.....	47
5.2.4 A análise das amostras provenientes de postos de combustível.....	49
5.3 A seleção de novas fases móveis a serem empregadas na CLAE-FN-IR utilizando a teoria de Hansen.....	53
5.4 A validação do método.....	58
5.4.1 A avaliação da Linearidade.....	58
5.4.2 A avaliação do limite de detecção (LD).....	59
5.4.3 A avaliação do limite de quantificação (LQ).....	60
5.4.4 A avaliação da exatidão.....	61
5.4.5 A avaliação da precisão.....	61
5.4.6 A avaliação da robustez.....	62
5.5 O emprego do teste t- pareado para a comparação entre o método proposto (CLAE-FN) e o método de referência (espectroscopia na região do IV) .....	66
6. Conclusões.....	67
7. Perspectivas.....	69
8. Referências.....	69
 ANEXO A- Especificações do biodiesel segundo o regulamento técnico nº 3/2014.....	 74
ANEXO B - Especificações do diesel BX a B30 segundo norma da ANP nº 30/2016.....	76
ANEXO C - Tabela com os valores críticos de Cochran (95% de confiança).....	78
ANEXO D - Tabela com os valores críticos para o teste t de student (MILLER & MILLER, 1993).....	79
APÊNDICE A– Cromatogramas referentes as fases móveis testadas como citado no item 5.3 deste trabalho.....	80



## 1. Introdução

O biodiesel é um combustível biodegradável obtido, principalmente, por meio da reação de transesterificação (SIDEBÉ,2010). O biodiesel foi inserido na matriz energética brasileira, em 2005, por meio da Lei nº 11.097. Deste então, ficou estipulado o crescente incremento da concentração mínima de biodiesel no óleo diesel vendido ao consumidor. A lei 13.263/2016 determinou o aumento do percentual volumétrico obrigatório de biodiesel no óleo diesel para 8% em 2017, 9% em 2018 e 10% em 2019. Contudo, a Resolução número 23 do Conselho Nacional de Pesquisa Energética (CNPE), publicada em 9 de novembro de 2017, antecipou um pouco esse processo. Essa resolução instituiu já em 2018 a adição de 10% em volume de biodiesel no óleo diesel. Dessa forma, atualmente todo o óleo diesel comercializado no país possui um percentual mínimo de 10% volumétrica de biodiesel (B10) (ANP, 2017).

Percebendo esse constante aumento do teor de biodiesel no óleo diesel, surge a necessidade de se monitorar a qualidade do biodiesel produzido e distribuído nos postos de abastecimento e verificar a existência de possíveis adulterações no óleo diesel comercializado.

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) estabelece por meio da Resolução ANP nº 45/2014 as especificações do biodiesel a ser comercializado e por meio da Resolução ANP nº 30/2016 as especificações do óleo diesel a ser comercializado (ANP,2017).

A adulteração de misturas biodiesel:óleo diesel com óleo vegetal é a mais passível de ser adotada, pois o óleo vegetal apresenta boa miscibilidade no óleo diesel e no biodiesel, além de possuir um valor de mercado inferior ao do biodiesel (VEMPATAPU *et al.*, 2017). O óleo vegetal também apresenta propriedades físico-químicas semelhantes ao óleo diesel e ao biodiesel, possibilitando que o combustível adulterado

atenda às especificações vigentes e ainda não seja detectado pelo método de referência (EN 14078)(CORGOZINHO *et al.*, 2008).

O método de referência, baseado na espectroscopia na região do infravermelho (EN 14078), empregado pela ANP para a verificação da quantidade de biodiesel presente no óleo diesel, não identifica a presença de óleo vegetal na mistura, o que pode causar sérios danos ao sistema automotivo e prejuízos econômicos ao consumidor (COSTA *et al.*, 1999).

Esse método baseia-se no fato de que substâncias carboniladas (como os ésteres, componentes majoritários do biodiesel) apresentam absorções características do grupo carbonila (C=O) na região de  $1750\text{ cm}^{-1}$ . Como a absorção do biodiesel e de grupos que contenham em sua estrutura o grupo carbonila ocorre no mesmo comprimento de onda (em torno de  $1750\text{ cm}^{-1}$ ), o método de referência não é capaz de identificar uma possível adulteração com óleo vegetal em uma mistura biodiesel:óleo diesel. Por esse motivo, torna-se necessária a investigação de um método capaz de detectar tais alterações.

Esse trabalho visa utilizar a cromatografia líquida de alta eficiência para desenvolver um método que seja capaz de quantificar o teor de biodiesel no óleo diesel e seja também capaz de identificar e quantificar possíveis adulterações com óleos vegetais presentes nessas misturas BX, onde X é o teor % volumétrica de biodiesel adicionado ao óleo diesel.

## **2. Objetivo**

### **2.1 Objetivo Geral**

Empregar a cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal (CLAE-FN), utilizando o detector de índice de refração (IR), para a quantificação de biodiesel em misturas biodiesel: óleo diesel e detecção de possíveis adulterações destas misturas por óleo vegetal.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Dentre os objetivos específicos deste projeto, podemos destacar:

1. Preparar das amostras ternárias de biodiesel, óleo diesel e óleo vegetal (óleo de soja) para serem empregadas no desenvolvimento do método proposto;
2. Analisar das amostras pelo método de referência (espectroscopia na região do IV, método EN 14078);
3. Analisar das amostras pelo método proposto, cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal, utilizando o detector de índice de refração (CLAE-FN-IR);
4. Empregar da teoria de Hansen para a seleção de novas fases móveis a serem empregadas na CLAE-FN-IR;
5. Comparar dos resultados obtidos pelos métodos de referência (espectroscopia na região do IV, método EN 14078) e o proposto (CLAE-FN-IR), mediante utilização de ferramentas estatísticas;
6. Avaliar de alguns parâmetros de validação do método proposto (linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez).

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Os óleos vegetais

Os óleos são compostos orgânicos formados por ácidos carboxílicos de cadeia longa que podem ser de origem vegetal ou animal. Os óleos de origem vegetal são predominantemente constituídos de ácidos graxos insaturados e os óleos de origem animal são predominantemente constituídos de ácidos graxos saturados. Nesse trabalho, utilizou-se apenas óleos vegetais. Os óleos vegetais tem em sua composição majoritariamente triacilgliceróis (TAG). A **Tabela 1** expõe a composição química, em ácidos graxos (% massa), de alguns óleos vegetais. É possível observar que alguns óleos vegetais são compostos majoritariamente por ácidos graxos saturados e outros são compostos majoritariamente de ácidos graxos insaturados

**Tabela 1.** Composição química, em ácidos graxos (% massa), de alguns óleos vegetais (Adaptado de ANDRADE,2011).

Óleo	C<14	C14:0	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C18:1	C	C22:1	C24:1
Vegetal			16:0	18:0	20:0	22:0	24:0	16:1	18:1	18:2	18:3	12OH	20:1			
Algodão	<0,1	<2,0	17,0- 31,0	0,90- 4,0	<0,7	<0,5	<0,5	<2,0	13,0- 44,0	33,0- 59,0	<2,1	-	<0,5	<0,5	-	-
Canola	<0,1	<0,2	1,5- 6,5	0,5- 3,1	<3,0	<2,0	<2,0	<3,0	8,0- 70,0	9,0- 30,0	5,0- 13,0	-	0,1- 15,0	<2,0	<3,0	<3,0
Girassol	<0,4	<0,5	3,0- 10,0	1,0- 10,0	<1,5	<1,3	<0,5	<1,0	13,0- 40,0	48,0- 75,0	<0,3	-	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Milho	<0,3	<2,0	6,0- 14,0	0,5- 5,0	<1,0	<0,5	<0,5	<0,5	24,0- 49,0	6,0- 62,0	<2,0	-	<0,5	-	-	-
Soja	<0,1	<0,5	6,0- 14,0	1,4- 5,5	<1,0	<0,7	<0,4	<0,5	18,0- 30,0	44,0- 64,0	4,0- 11,0	-	<1,0	-	-	-
Palma	<0,4	0,5- 2,0	35,0- 47,0	3,5- 6,5	<1,0	-	-	<0,6	36,0- 47,0	6,5- 15,0	<0,5	-	-	-	-	-
Mamona	-	-	0,1- 2,0	0,9- 3,1	-	2,1	-	<3,0	2,8- 6,0	1,2- 5,0	<0,5	84,0- 91,0	-	-	-	-

Os TAG que são lipídeos, podem se apresentar em mais de uma forma dependendo da temperatura a qual estão submetidos. A temperatura ambiente, por exemplo, o sebo bovino é sólido e o óleo de soja tem o aspecto de óleo.

Os lipídeos são substâncias químicas, derivadas ou compostas de ácidos graxos, que possuem alta solubilidade em solventes orgânicos mas baixíssima solubilidade em água. Existem diversos tipos de lipídeos. Os lipídeos que possuem ácidos graxos em sua composição são capazes de reagir com uma base formando sabão ou biodiesel (SOUZA *et al.*, 2007).

Há diversos tipos de óleos vegetais com composições distintas de ácidos graxos. A **Tabela 2** mostra a fórmula estrutural, o nome sistemático e a relação entre o número de carbono (NC) e o número de ligações duplas (NLD) de alguns desses ácidos graxos que estão presentes nos óleos vegetais.

**Tabela 2.** Fórmula estrutural de alguns ácidos graxos (LEITE *et al.*, 2013)

Ácido Graxo	Nome sistemático	NC:NLD	Fórmula
Láurico	Ácido Dodecanóico	12:0	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Mirístico	Ácido Tetracanóico	14:0	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Palmítico	Ácido Hexadecanóico	16:0	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Esteárico	Ácido Octadecanóico	18:0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
Aracnídico	Ácido Eicosanóico	20:0	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>
Berénico	Ácido Docosanóico	22:0	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>
Lignocérico	Ácido Tetracosanóico	24:0	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>
Oléico	Ácido Cis-9-octadecenóico	18:1	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Linoleico	Ácido Cis-9, cis-12- octadecadienóico	18:2	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Linolênico	Ácido Cis-9, cis-12, cis - 15-octadecatrienóico	18:3	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Erucico	Ácido Cis-13-docosenóico	22:1	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>

*NC: Número de Carbonos*                      *NLD: Número de ligações duplas*

A utilização de óleos vegetais como combustíveis iniciou no século XIX quando Rudolph Diesel inventou os motores a óleo diesel. Na época, buscando motores mais compactos e buscando melhorar a combustão, os óleos vegetais foram substituídos pelo petróleo e/ou carvão pulverizado. Por esse motivo, toda a evolução dos motores foram utilizando como base derivados do petróleo como combustível, portanto, os motores a diesel utilizados hoje em dia não suportam a utilização de óleo vegetal puro como combustível (MOTA *et al.*, 2009).

Com o aumento do preço dos derivados do petróleo e o aumento de uma consciência sustentável, voltou-se a considerar a possibilidade de utilizar os óleos vegetais como combustíveis. Alguns testes bem sucedidos foram feitos utilizando óleo

vegetal como combustível com algumas modificações no motor a diesel, porém, não houve um estudo a longo prazo, na época, para estudar a continuidade do funcionamento dessas operações. Os testes indicavam que o motor era capaz de continuar funcionando adicionando 10% volumétrica em volume de óleo vegetal ao óleo diesel (NARAYAN,2002; PRAMANIK,2003).

Hoje sabe-se que o uso do óleo vegetal puro ou sua mistura com o óleo diesel é prejudicial para o motor a diesel. Essa incompatibilidade ocorre devido a alta viscosidade do óleo, que pode obstruir os bicos injetores no motor, a sua composição ácida, o teor alto de ácidos graxos livres, a possível polimerização durante o processo de combustão ou durante o armazenamento, depósitos de carbono, espessamento do óleo lubrificante devido a contaminação com óleo vegetal, tornando o sistema de lubrificação ineficiente, dentre outros problemas (YUSUF *et al.*, 2011; CORGOZINHO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*,2016).

Para minimizar os efeitos da alta viscosidade do óleo vegetal, utilizou-se uma reação de transesterificação desse óleo. A reação de transesterificação do óleo vegetal gera alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, chamado de biodiesel. Hoje, o biodiesel está inserido na matriz energética brasileira não como substituto completo do óleo diesel, mas como uma mistura com o óleo diesel que não afeta de forma negativa o desempenho do motor a diesel como uma mistura com o óleo vegetal puro poderia fazer (BROUCK,2012).

### **3.2 O Biodiesel**

O mundo vive atualmente um momento muito diferente do que se vivia há décadas atrás. Essa mudança começou após a primeira crise do petróleo que ocorreu em 1973. Essa crise de energia se deu por dois motivos: o rápido aumento da população mundial e a mudança no estilo de vida do ser humano (CHANDRASEKARAN, 2016).

Nesse momento, o mundo percebeu que os recursos fósseis utilizados de forma indiscriminada eram recursos finitos e que corriam, portanto, o risco de esgotamento se continuassem sendo usados indiscriminadamente. Além disso, conforme as reservas de petróleo diminuem, os preços dos combustíveis derivados do petróleo como o óleo diesel, tendem a subir tornando-os, a longo prazo, não tão atrativos economicamente (LUE *et al.*, 2001).

Além de uma possível escassez dos recursos fósseis, outros fatores que levaram ao uso e pesquisas no desenvolvimento de combustíveis renováveis foi a consciência ambiental, uma vez que os combustíveis fósseis são responsáveis por emitir muitos gases poluentes para a atmosfera. A incidência de catástrofes naturais, o aquecimento global, o desmatamento fizeram com que o ser humano começasse a pensar de forma mais sustentável e, dessa forma, começou-se a pensar em fontes renováveis de energia (AVINASH, 2014; CHANDRASEKARAN, 2016).

Há diversas fontes de energia renováveis como o vento, a energia solar, a geotérmica e a biomassa que podem cumprir o critério de sustentabilidade exigido atualmente no mundo. Porém, é importante também que essa energia renovável seja viável economicamente e nem todas as fontes de energia renovável o são. Uma boa opção que é tanto viável economicamente quanto sustentável são os biocombustíveis. Eles são produzidos a partir de biomassa que é uma matéria prima limpa, renovável e disponível (YUSUF *et al.*, 2011) .

Toda essa preocupação com a saúde do planeta e a preocupação com viver uma vida mais sustentável fez com que, ao longo dos anos, pesquisadores ao redor do mundo comessem a buscar combustíveis alternativos ao petróleo e seus derivados. Nesse sentido, o biodiesel aparece como uma boa opção já que tem propriedades físico-químicas parecidas com o óleo diesel convencional, é biodegradável, apresenta alto ponto de fulgor e, principalmente, vem de uma fonte renovável: a biomassa, então, traz

uma redução na emissão de gases poluentes para a atmosfera como o enxofre e aromáticos (AGARWAL 2007; ALTIN *et al.*, 2000)

Segundo a ANP, o biodiesel é o “combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da reação transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal, e que atenda a especificação contida no regulamento técnico nº 3/2014 (Anexo A), parte integrante da Resolução 45(ANP,2014).

Esse produto é caracterizado por ser livre de enxofre e aromáticos, ter alto nível de cetano (que está relacionado com a velocidade de ignição), possuir maior viscosidade e ponto de fulgor que o óleo diesel convencional, o que torna o transporte e armazenamento desse combustível mais seguro que o óleo diesel, além de aumentar a vida útil do motor. A principal vantagem do biodiesel frente ao óleo diesel é seu apelo ambiental. Esse ponto positivo ocorre pelo fato do biodiesel ser obtido através de fontes renováveis e não de fontes fósseis como o óleo diesel, diminuindo a emissão de gases poluentes como o CO<sub>2</sub>. Todos esses fatores aliados a crise do petróleo tornam o biodiesel um possível substituto do óleo diesel como combustível. (COSTA *et al.*, 2000; AVINASH *et al.*, 2014).

As principais desvantagens apontadas pela literatura sobre a utilização do biodiesel enquanto combustível é a sua dificuldade de escoamento a frio, a possibilidade de oxidar com o ar em altas temperaturas e o preço superior ao óleo diesel convencional (FERRÃO *et al.*, 2011; DEMIRBAS, 2007).

O biodiesel pode ser utilizado como aditivo ou mistura ao óleo diesel em até 20% volumétrica sem nenhuma modificação ao motor e sem alterar negativamente o desempenho do motor. Ao se utilizar uma adição maior que 20% volumétrica de biodiesel no óleo diesel, seriam necessárias pequenas alterações no motor a diesel uma vez que

as propriedades físicas do biodiesel são bastante parecidas com às do óleo diesel (UDAETA *et al.*,2004; ASLIKE,2010).

No Brasil a inserção do biodiesel enquanto combustível foi dada em 13 de janeiro de 2005 com a lei nº 11.097. Essa lei foi um marco no uso do biodiesel nacional, uma vez que passou a introduzir de maneira gradativa o biocombustível na matriz energética brasileira. Essa lei, instituiu a criação da mistura BX, onde o diesel comercializado no país seria adicionado de um teor específico estabelecido por lei. Nesse primeiro momento (2005-2008) foi instituído uma adição de 2% volumétrica de biodiesel no óleo diesel (B2) de forma facultativa. Em 2008, a adição de 2% volumétrica de biodiesel passou a ter caráter obrigatório e não mais facultativo. Depois dessa determinação, o objetivo, visando valorizar a produção de biodiesel nacional, foi aumentar esse teor cada vez mais. Em julho de 2008, a mistura obrigatória passou a ser a B3 que corresponde a uma adição de 3% volumétrica de biodiesel no óleo diesel. Em julho de 2009, a mistura obrigatória passou a ser a B4 que corresponde a uma adição de 4% volumétrica de biodiesel ao óleo diesel, segundo a resolução ANP número 7 publicada em março de 2008. Em janeiro de 2010, a obrigatoriedade passou a ser de 5% volumétrica de biodiesel no óleo diesel (B5). Em 2014 a lei 13.033/2014 foi aprovada, instituindo, para julho, que a mistura obrigatória passasse a ser a B6 que contempla um teor de 6% volumétrica de biodiesel no óleo diesel e, para novembro, que a mistura obrigatória passasse a ser a B7 que contempla um teor de 7% volumétrica de biodiesel no óleo diesel.

Seguindo no conceito de aumentar gradativamente o teor de biodiesel no óleo diesel, a lei 13.263/2016 instituiu para março de 2017 que a mistura BX que estaria em vigor é a B8 que contempla um teor de 8% volumétrica de adição de biodiesel no óleo diesel. A lei contemplava também, inicialmente, aumentos percentuais consecutivos para 9% volumétrica de biodiesel no óleo diesel (B9), em 2018 e 10% volumétrica de biodiesel

no óleo diesel (B10), em 2019. Porém, com a aceitação do mercado e visando aquecer ainda mais a produção de biodiesel no país a resolução nº 23, publicada em 9 de novembro de 2017 pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) adiantou um pouco esse processo. Essa resolução instituiu já em 2018 que a adição de 10% volumétrica de biodiesel no óleo diesel. Dessa forma, a mistura de biodiesel ao óleo diesel passou por diversas fases, até chegar a fase atual (10 % volumétrica de biodiesel, B10).

Passados treze anos desde a sua inserção na matriz energética brasileira, por meio da Lei Nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005, a cadeia produtiva do biodiesel teve de superar diversos obstáculos, ligados não apenas ao processo produtivo e ao de logística, mas, sobretudo àqueles relativos à qualidade intrínseca requerida para o produto, ou seja, os aspectos técnicos e de qualidade que devem ser atendidos para que o uso pretendido seja possível (MIRANDA, MOURA, 2016).

Recentemente, por meio do decreto nº 44210 de 08 de janeiro de 2018, o prefeito da cidade do Rio de Janeiro, Marcelo Crivella, no uso das atribuições que lhe são conferidas pela legislação em vigor, decretou que as empresas concessionárias do Sistema de Transporte Público por Ônibus são obrigadas a utilizar 20% de biodiesel (B20) em adição ao combustível fóssil (diesel) utilizado em sua frota, visando reduzir suas emissões em 70% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Este decreto entrou em vigor na data de sua publicação, produzindo seus efeitos sessenta dias após a sua edição. Entretanto, segundo informações da ANP as empresas de ônibus ainda não conseguiram se adequar ao decreto e, portanto, não estão utilizando o B20. Este decreto considerou que: (i) a adição de B20, segundo os Centros de Pesquisas, promove a diminuição de gases tóxicos em 14%, incluindo o Monóxido de Carbono (CO), Óxidos de Enxofre (SOx), Hidrocarbonetos (HC) e material particulado (MP), refletindo na diminuição das doenças respiratórias, alérgicas, cardiovasculares, neurológicas e

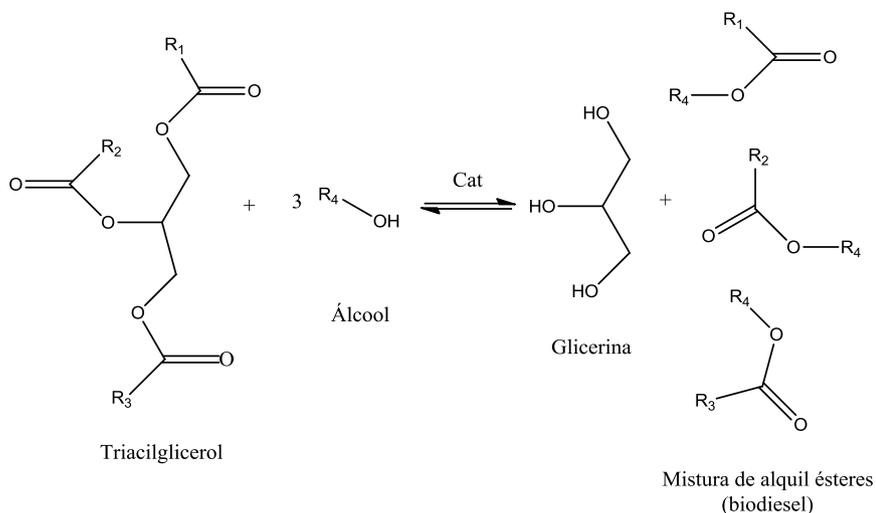
câncer de pulmão, reduzindo, ainda, o custo das internações hospitalares nas grandes metrópoles em valores consideráveis;(ii) a adição de biodiesel segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), reduz as emissões de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>), reduzindo assim o aumento da temperatura atmosférica, as alterações climáticas e a proliferação de mosquitos da Dengue, Malária, Febre amarela, evitando levar a óbito adultos, idosos e, principalmente, crianças em populações de baixa renda; (iii) a adição de B20 tem o potencial de criar milhares de empregos na indústria de biodiesel, notadamente, pela capacidade instalada ociosa de produção, possibilitando ainda a diminuição da importação nacional de diesel fóssil, que hoje se encontra na ordem de 12 bilhões de litros/ano ao custo de uma evasão de U\$ 7 bilhões por ano em divisas; (iv) os testes realizados pela FETRANSPOR, em concessionárias da PCRJ, supervisionadas pela ANP/RJ, pelo Instituto Estadual do Ambiente – INEA/RJ, e pela PETROBRAS e Centros de Pesquisas, conclui-se que, a adição de B20 não alterou o rendimento dos motores em comparação àqueles movidos à diesel fóssil e (v) os preços do biodiesel e do diesel fóssil são determinados por fatores exógenos e que a variabilidade estatística no período de 2014 a 2017 se mostra no mínimo compensatória, não havendo acréscimo de custo.

O governo federal publicou no Diário Oficial da União (DOU) de 16 de março de 2018, o Decreto 9.308/2018, que dispõe sobre a definição das metas compulsórias anuais de redução de emissões de gases causadores do efeito estufa para a comercialização de combustíveis. O texto regulamenta a Lei 13.576/2017, que instituiu a Nova Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio). O RenovaBio é uma política de Estado que objetiva traçar uma estratégia conjunta para *reconhecer o papel estratégico de todos os tipos de biocombustíveis na matriz energética brasileira*, tanto para a segurança energética quanto para mitigação de redução de emissões de gases causadores do efeito estufa. Diferentemente de medidas tradicionais, *o RenovaBio não propõe a criação de imposto sobre carbono, subsídios, crédito presumido ou mandatos*

volumétricos de adição de biocombustíveis a combustíveis. O decreto 9.308/2018 prevê multa de até R\$ 50 milhões para distribuidoras de combustíveis fósseis, como gasolina e óleo diesel, que não compensarem as emissões de gases causadores do efeito estufa. A norma determina que o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) será o órgão responsável por determinar as metas gerais de reduções de emissões de gases causadores do efeito estufa, sob recomendação do Comitê Interministerial sobre Mudança do Clima (CIM). As metas compulsórias serão desdobradas pela ANP, para cada ano corrente, em metas individuais, aplicadas a todos os distribuidores de combustíveis, proporcionais à respectiva participação de mercado na comercialização de combustíveis fósseis no ano anterior. Quanto aos prazos, as metas compulsórias anuais de redução de emissões serão definidas até 15 de junho de 2018, para vigorar no período de 24 de junho de 2018 a 31 de dezembro de 2028. Já as metas individuais serão definidas e tornadas públicas até 1º de julho de 2019, para vigorar a partir de 24 de dezembro de 2019.

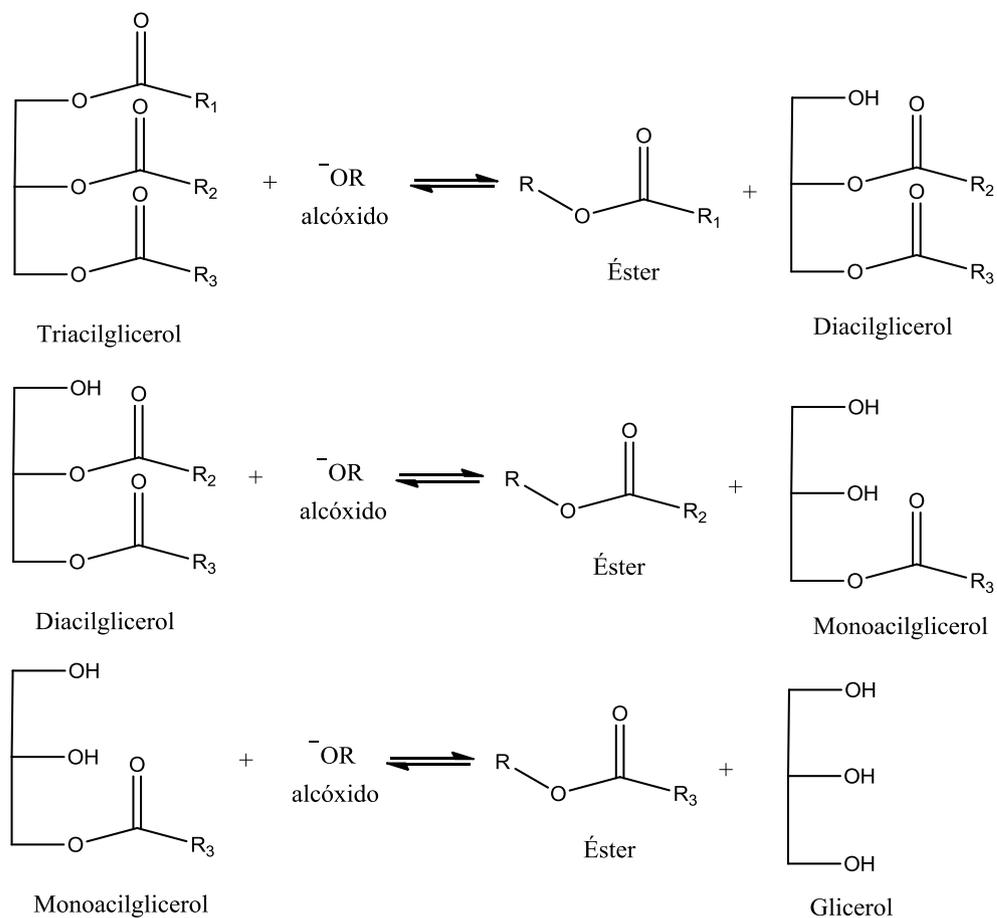
### **3.3 A produção do biodiesel**

O processo de transesterificação utilizado para a obtenção do biodiesel ocorre através da transformação de triacilgliceróis na presença de um catalisador ácido ou básico e de um álcool de cadeia curta em ésteres de ácidos graxos tendo como subproduto o glicerol ou glicerina (DEMIRBAS,2007). A utilização de catalisadores básicos é mais comum, sendo os mais usuais o KOH e o NaOH. Os catalisadores ácidos tem-se as limitações de uma cinética lenta e problemas de corrosão. Já no caso de um catalisador básico a limitação é a possibilidade de saponificação (SUAREZ *et al.*, 2015). A reação de transesterificação para produção de biodiesel é mostrada na **Figura 1**.



**Figura 1.** Reação de transesterificação (ARAUJO,2017). Os grupos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> representam as cadeias hidrocarbônicas alifáticas saturadas ou insaturadas; podendo ser iguais ou diferentes, e o grupo R<sub>4</sub> representa a cadeia do álcool utilizado.

A reação de transesterificação ilustrada na **Figura 1**, ocorre em três etapas como representado na **Figura 2**.



**Figura 2.** Reações consecutivas para a produção do biodiesel (ARAUJO, 2017). Os grupos  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  representam as cadeias hidrocarbônicas alifáticas saturadas ou insaturadas; podendo ser iguais ou diferentes, e o grupo R representa a cadeia do álcool utilizado.

Na primeira etapa o triacilglicerol (TAG) reage com a primeira molécula de álcool (na presença do catalisador) dando origem a uma molécula de éster de ácido graxo (biodiesel) e uma de diacilglicerol (DAG). Na segunda etapa, o diacilglicerol reage com a segunda molécula de álcool (na presença do catalisador) dando origem a uma molécula de éster de ácido graxo (biodiesel) e uma molécula de monoacilglicerol (MAG). Na última etapa, o monoacilglicerol reage com outra molécula de álcool dando origem a mais uma molécula de éster de ácido graxo (biodiesel) e uma molécula de glicerol que é o subproduto da reação (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2016).

A reação de transesterificação é reversível. No caso da reação ilustrada na **Figura 2** isso é desprezível já que o subproduto (glicerina) não é solúvel no produto de interesse (biodiesel). Ainda assim, para evitar esse processo e deslocar o equilíbrio da reação no sentido a favorecer a formação do biodiesel, utiliza-se excesso de álcool na reação de transesterificação para produção de ésteres de ácidos graxos (SCHWAB *et al.*, 1987).

### **3.4 A qualidade do biodiesel**

Existem algumas normas ao redor do mundo para verificar se o biodiesel produzido é de qualidade. A especificação do biodiesel dentro dos parâmetros estabelecidos por essas normas é importante para evitar não conformidades que podem ser causados ao motor a diesel ao ser submetido a uma mistura BX que esteja fora dessas especificações. Um problema que pode ocorrer é o entupimento dos filtros devido a deposição de resíduos de triacilgliceróis não reagidos na reação de transesterificação dos óleos vegetais, resíduo dos catalisadores e etc (HOLCAPEK *et al.*, 1999).

A resolução da ANP que rege a qualidade do biodiesel brasileiro atualmente é a de nº 45 e ela foi publicada em 25 de agosto de 2014. Nessa resolução temos os 24 parâmetros determinados no regulamento técnico ANP nº3/2014 (ver Anexo A) a serem considerados para considerar o biodiesel apto ou não para servir de mistura com o óleo diesel e chegar ao consumidor.

De todos esses parâmetros mostrados na tabela apresentada no Anexo A , os dois mais críticos são a densidade e a viscosidade pois eles são os responsáveis pelo controle do bombeamento e da circulação do combustível na câmara de injeção (FAGUNDES *et al.*,2007).

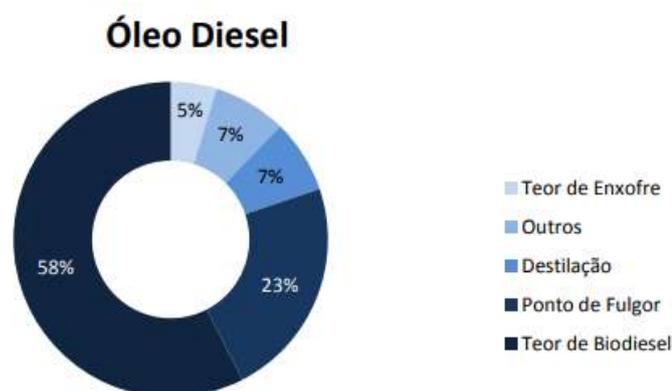
O óleo diesel comercializado no Brasil também tem normas nas quais se basear. A norma regulamentadora mais recente que especifica esse produto é a de nº 30, publicada em 23 de junho de 2016. Os parâmetros estabelecidos nessa norma estão apresentados no Anexo B.

Como visto na tabela apresentada no Anexo B há diversos parâmetros sob os quais o óleo diesel precisa se adequar para ser considerado apto para ser comercializado no Brasil. Um desses parâmetros é o teor de biodiesel no óleo diesel, objeto de estudo deste projeto.

A ANP tem um programa de monitoramento de combustíveis no qual são coletadas amostras de diversos postos de combustíveis em diversos estados brasileiros. Essas amostras são analisadas por laboratórios credenciados e selecionados por estado. Dessa forma, tem-se, mensalmente, o boletim de monitoramento da qualidade dos combustíveis disponível no site da ANP.

Analisando o boletim de monitoramento da qualidade dos combustíveis emitido pela ANP em março de 2018, pode-se descobrir quais são os parâmetros dentre os apresentados no Anexo B que apresentam maior frequência de não conformidade para

o óleo diesel. A **Figura3** mostra as principais características não conformes para o óleo diesel.



**Figura3.** Principais características não conformes para o óleo diesel em março/2018 segundo boletim das qualidades dos combustíveis de março/2018(ANP, 2018).

Os parâmetros especificados na **Figura 1** por “Outros” são a cor, massa específica, teor de água e aspecto (ANP,2018).

Analisando o **Figura3** é possível constatar que, no mês de março, 58% de todas as não conformidades encontradas pelo monitoramento de combustíveis da ANP no país foi referente ao teor de biodiesel no óleo diesel. Dessa forma, vemos que de todos os parâmetros analisados aquele que apresenta o maior índice de não conformidade é o teor de biodiesel no óleo diesel. Esse dado mostra o quanto é importante um método eficaz para a medição do teor de biodiesel no óleo diesel a fim de manter a qualidade do combustível utilizado no país.

### **3.5 Os métodos para a determinação do teor de biodiesel no óleo diesel e para identificação de possíveis adulterações**

Como já citado, o óleo vegetal tem algumas características físico-químicas relativamente parecidas com o biodiesel, fazendo dele um possível produto a ser utilizado para adulteração do óleo diesel. Dois fatos tornam essa possibilidade mais passível de acontecer: o fato do óleo vegetal ser muito mais barato que o biodiesel e o

fato de, a olho nu, não ser possível identificar essa adulteração já que o óleo vegetal é miscível no óleo diesel da mesma forma que o biodiesel, não alterando sua coloração a olho nu (VEMPATAPU *et al.*, 2017).

Nesse trabalho serão discutidos dois métodos de quantificação do teor do biodiesel do óleo diesel: a espectroscopia na região do IV e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### **3.5.1 A espectroscopia na região do infravermelho**

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é uma técnica que verifica, através de absorções em faixas de comprimentos de ondas determinadas, a presença de grupos funcionais que podem nos dar uma ideia de qual é a estrutura da molécula (CASTRO,2009).

Para que ocorra uma absorção da radiação infravermelha é necessário que haja uma variação no momento de dipolo elétrico da molécula. Essa variação ocorre por conta do movimento vibracional ou rotacional dessa molécula a fim de gerar, então, o espectro de absorção (PAIVA *et al.*,2001).

O espectro de infravermelho utilizado comumente para analisar moléculas e amostras conhecidas ou desconhecidas é dividido em três partes e mostra a radiação com comprimentos de onda no intervalo de 12800 a 10  $\text{cm}^{-1}$ . As três partes são infravermelho distante, médio e próximo. A região do infravermelho médio compreende a radiação com comprimentos de onda de 400  $\text{cm}^{-1}$  a 4000 $\text{cm}^{-1}$ . Essa é a região utilizada pela ANP para análise quantitativa do teor de biodiesel no óleo diesel segundo a norma EN14078 e ABNT NBR15568, como mostrou a tabela apresentada no Anexo B. (COSTA,2015; COSTA *et. al.*,2015)

A possibilidade de se utilizar espectros de infravermelho para determinar o teor de biodiesel no óleo diesel veio do fato dos dois combustíveis apresentarem funções

químicas distintas. O óleo diesel tem predominância de hidrocarbonetos enquanto o biodiesel apresenta a banda da carbonila C=O que aparece na região do infravermelho médio em torno de  $1750\text{ cm}^{-1}$ . Essa região é conhecida como a banda da carbonila (GUARIEIRO,2008).

Em 2001, Knothe utilizou a espectroscopia da região do infravermelho próximo e regressão parcial de mínimos quadrados (PLS) para concentrações variando de 0% a 100% volumétrica (KNOTHE,2001)

Em 2004, Guarieiro obteve espectros de infravermelho de misturas biodiesel:óleo diesel utilizando uma medida realizada a partir da banda da carbonila dos ésteres localizada na região do infravermelho médio em torno de  $1745\text{ cm}^{-1}$ . Ele analisou biodiesel produzido a partir de diferentes tipos de óleos vegetais (soja, milho, canola, girassol e linhaça). Esses biodieseis foram adicionados ao óleo diesel em diferentes volumes para criar amostras BX, sendo o X o valor (em % volumétrica) de biodiesel adicionado ao óleo diesel. As misturas BX analisadas por Guarieiro foram; B1, B2, B3, B4,B5 e B100. Devido a variabilidade das amostras realizadas e bons resultados encontrados, pode-se concluir que a espectroscopia do infravermelho na região de  $1745\text{ cm}^{-1}$  é capaz, a princípio, de quantificar o teor de biodiesel no óleo diesel (GUARIEIRO,2004).

Em 2008, Guarieiro *et al.*refinaram sua técnica e propuseram essa metodologia para a determinação do teor do biodiesel no óleo diesel utilizando a espectroscopia da região do infravermelho médio observando a faixa de  $1850 - 1650\text{ cm}^{-1}$ . Eles obtiveram um desvio inferior a 0,002 (0,2% volumétrica) e se mostraram capazes de medir o teor de biodiesel no óleo diesel em misturas que contenham acima de 0,1% volumétrica de biodiesel. As determinações desses teores foram feitas a partir da construção de uma curva analítica (GUARIEIRO,2008).

Em 2010, Vieira *et al.* utilizaram a espectroscopia na região do IV e análise por componentes principais (PCA), para a avaliação da adulteração de misturas biodiesel/diesel. Os autores utilizaram a espectroscopia na região do IV com reflexão total atenuada (ATR). Foram utilizadas concentrações de 0,5 a 30% volumétrica. Foi utilizado um algoritmo chamado de iPCA para avaliar as faixas espectrais e encontrar a separação entre os óleos vegetais, o biodiesel e o óleo diesel (VIEIRA, 2010).

Ainda em 2010, Aslike utilizou a espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para determinar o teor de biodiesel no óleo diesel. Aslike não teve pretensão de identificar algum tipo de adulteração com óleo vegetal nessas misturas. Ele utilizou a região do espectro entre 1700 e 1800  $\text{cm}^{-1}$  que é a região onde ocorre o pico de absorção da carbonila C=O, grupo que diferencia, no espectro, o óleo diesel do biodiesel. Ele identificou que o método é capaz de identificar uma linearidade entre a altura/área do pico e a concentração do biodiesel. Aslike percebeu também que a matriz da qual o biodiesel veio não influencia no resultado, desde que se tenha uma curva analítica para cada um desses casos (ASLIKE, 2010).

Em 2011, Gaydou *et al.* utilizaram simultaneamente a espectroscopia na região do infravermelho próximo (MIR) e infravermelho médio (NIR) para predizer uma possível adulteração por óleo vegetal em misturas biodiesel:óleo diesel. Foram utilizadas regressões de mínimos quadrados parciais (PLS) nas duas regiões separadamente. Embora os resultados de ambas tenham sido satisfatórios, a NIR obteve resultados superiores (GAYDOU, 2011).

Também em 2011, Ferrão *et al.* utilizaram a calibração multivariada para determinar o teor de biodiesel, a densidade, o ponto de fulgor e o teor de enxofre nas misturas BX. Continuando seus estudos com VIEIRA, a metodologia utilizada foi uma regressão por mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS) (FERRÃO *et al.*, 2011).

Em 2012, Vasconcelos *et al.* utilizaram a espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) para a quantificação de misturas biodiesel:óleo diesel adulteradas com óleo vegetal. A regressão usada foi por mínimos quadrados parciais (PLS) e regressão linear múltipla (MLR). Os melhores resultados encontrados pelos autores foram utilizando um caminho ótico de 10mm e a técnica MLR para a regressão (VASCONCELOS *et al.*, 2012).

Em 2013, Werlang *et al.* empregaram FTIR/ATR construindo modelos de calibração PLS para quantificar o teor de biodiesel e óleo vegetal em misturas BX adulteradas com óleo vegetal. Foram analisadas misturas até B8 (8 % volumétrica de biodiesel no óleo diesel). Os resultados encontrados foram satisfatórios e mostraram que essa técnica é promissora para detectar esse tipo de adulteração (WERLANG *et al.*, 2013).

Em 2014, Gontijo *et al.* também usaram regressão por mínimos quadrados (PLS) para quantificar o teor de biodiesel em óleo diesel utilizando a norma ASTM E1655. O método foi capaz de quantificar biodiesel de soja em misturas binárias com óleo diesel. Não foram testadas amostras adulteradas com óleo vegetal pois o método utilizado tanto pela norma ASTM E1655 quanto pela EN14078 não é capaz de identificar tais adulterações (GONTIJO *et al.*, 2014).

Em 2015, Paiva *et al.*, estudaram o desempenho de um espectrômetro portátil de infravermelho próximo (NIR) para determinar tanto o teor de biodiesel em misturas biodiesel:óleo diesel quanto na quantificação de adulterações por óleos vegetais. A faixa analisada nos espectros foi de 950-1650nm. Os resultados foram obtidos através de um espectrofotômetro ultracompacto (MicroNIR) e um instrumento de bancada de transformada de Fourier (FT-NIR) utilizando a faixa de 800 a 2500nm. Para a regressão utilizaram inicialmente modelos de mínimos quadrados parciais (PLS) e depois o algoritmo de projeções sucessivas (SPA) para determinar quais variáveis deveriam ser

utilizadas na regressão linear múltipla (MLR). Os resultados encontrados no estudo foram satisfatórios e mostraram que a estratégia de regressão que utiliza MLR-SPA é mais eficiente do que a PLS (PAIVA *et al.*, 2015).

Em 2017, Câmara *et al.* trabalharam com FT-NIR e FT-MIR utilizando regressão MCR-ALS e PLS para quantificar adulteração com óleo vegetal nas misturas biodiesel:diesel. Nesse trabalho os autores conseguiram além de identificar e quantificar a adulteração por óleos vegetais, através do MCR-ALS, recuperar os perfis espectrais dos componentes puros das misturas, separando e identificando a substância contaminante, podendo, dessa forma, proceder de forma mais hábil sobre como teria sido o processo de adulteração daquela amostra. A regressão em PLS foi utilizada, neste caso, apenas como um método comparativo da metodologia proposta para quantificar o adulterante já que ela por si só não é capaz de extrair o perfil espectral do contaminante da mistura BX (CÂMARA *et al.*, 2017).

### **3.5.2 A cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica que pode ser aplicada em diversos ramos seja em pesquisa ou em acompanhamento de processos industriais. Essa técnica tem algumas características que as diferem de outras técnicas analíticas usuais, dentre elas temos um menor tempo de análise entregando ainda assim análises precisas, alto poder de resolução, a viabilização da quantificação de compostos voláteis, a não necessidade de reagentes derivatizantes, a não necessidade de altas temperaturas para análise, a possibilidade de automatização do processo de análise e do processamento de dados (MALDANER,2009; CZAUDERNA, 2001).

As análises por CLAE são realizadas, geralmente, em colunas que possuem a fase estacionária compactada em coluna de aço inoxidável, com diâmetro interno variando entre 0,45 e 2,2 cm e com comprimento variando entre 10 e 30 cm, dependendo do objetivo da separação. Os detectores mais comuns são o detector de absorção no

ultravioleta (UV), de fluorescência, de índice de refração e eletroquímicos (HOLCAPEK *et al.*,1999; ARAUJO,2017).

A CLAE requer, portanto, apenas que a amostra a ser analisada seja solúvel em sua fase móvel para que a análise seja possível, o que a torna uma técnica ideal para separação de espécies iônicas, produtos biológicos, e todo tipo de espécies termicamente sensíveis ou instáveis (CARDOSO,2012).

Em 1999, Holcapek *et al.* usaram a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa para determinar componentes provenientes da produção do biodiesel de canola utilizando como detector o ultravioleta (UV), o detector evaporativo de espalhamento de luz (DEEL) e o detector de espectrometria de massas por ionização química em pressão atmosférica (EM-IQPA). Os autores chegaram a conclusão que para determinar quantitativamente o rendimento da reação de transesterificação que gerou aquele biodiesel o melhor detector foi o DEEL (HOLCAPEK *et al.*, 1999).

Em 2005, Foglia *et al.* usaram a cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal (CLAE-FN) para quantificar o teor de biodiesel em misturas BX. Foram utilizados dois tipos de detectores; detector evaporativo com espalhamento de luz (ELSD) e UV. A coluna utilizada foi uma coluna de sílica e a fase móvel utilizada foi uma mistura de *n*-hexano com metil terc-butil éter (MTBE). Foram analisadas amostras com concentrações de a 1-30% volumétrica de biodiesel no óleo diesel. Essas amostras foram feitas com o uso de padrões. Foram construídas curvas analíticas e através delas foi possível obter o teor de biodiesel no óleo diesel em misturas BX de forma satisfatória (FOGLIA *et al.*, 2005).

Em 2011, Brandão *et al.* desenvolveram um método com o objetivo de controlar a qualidade do óleo diesel no sentido de identificar possíveis adulterações por óleos vegetais. Os autores usaram CLAE-UV (205 nm) associada a métodos multivariados como análise por componentes principais (PCA) e regressão parcial por mínimos



Em 2012, Brouck desenvolveu um trabalho utilizando a técnica CLAE-UV para detectar adulteração de biodiesel por óleos vegetais. Seis tipos de óleos vegetais foram utilizados nesse trabalho (algodão, canola, fritura, girassol, milho e soja) na faixa de concentração de 1-50% volumétrica. Foram injetadas amostras de biodiesel adulteradas com óleo vegetal e não da mistura óleo diesel:biodiesel:óleo vegetal. Através dos resultados obtidos, viu-se que a CLAE-UV (205 nm) é capaz de detectar possíveis adulterações no biodiesel com óleos vegetais (BROUCK,2012).

Em 2013, Leite *et al.* também utilizaram CLAE-UV para analisar frações do biodiesel obtidas após extração em fase sólida. Três frações foram analisadas; F<sub>2</sub>- Biodiesel e óleo vegetal, F<sub>3</sub>- biodiesel, F<sub>4</sub>- óleo vegetal. A fração 1 (F<sub>1</sub>) era composta apenas de óleo diesel e não foi utilizada para análise. O método de CLAE-UV mais uma vez se mostrou eficiente para identificar a adulteração por óleo vegetal (LEITE & FERNANDES, 2013).

### **3.6 A Teoria de Hansen**

O conceito de parâmetro de solubilidade foi desenvolvido primeiramente por Scatchard *et al.* (1940) e por Hildebrand & Scott (1950). O uso mais recorrente destes parâmetros refere-se à seleção de solventes para materiais de cobertura e tintas. Outras aplicações incluem a predição de compatibilidade entre solventes e polímeros, resistência química, taxas de permeação, caracterização superficial de pigmentos e fibras (HANSEN, 2007; GAO, 2014).

Hansen (2007) propôs a extensão do parâmetro de solubilidade, teorizado por Hildebrand, em três componentes, referentes aos três diferentes tipos de energia de interação intermolecular que são quebradas quando um composto químico passa por um processo de vaporização (GAO, 2014).

Os parâmetros de solubilidade de Hansen descrevem a energia coesiva total das moléculas ( $\delta T$ , **Equação 1**) como uma contribuição parcial das energias de interação dispersiva ( $\delta D$ ), polar ( $\delta P$ ) e de ligações de hidrogênio ( $\delta H$ ). Os parâmetros parciais são computados com auxílio de correlações matemáticas baseadas em métodos de contribuição de grupos, ou seja, são calculados sobre estrutura molecular conhecida do composto químico de interesse (HANSEN, 2007).

$$\delta T^2 = \delta D^2 + \delta P^2 + \delta H^2$$

**Equação 1:** Energia coesiva total das moléculas em função da contribuição parcial das energias (HANSEN,2007).

Os parâmetros de solubilidade descrevem frações da energia total de coesão (termos  $E_D, E_P, E_H$ ) que existe entre as moléculas de um líquido (HANSEN, 2007). Esta energia total de coesão está correlacionada com a energia de vaporização do líquido por meio da **Equação 2**.

$$\delta T^2 = \frac{\Delta E_{\text{vap}}}{V_{\text{mol}}} = \frac{E_D}{V_{\text{mol}}} + \frac{E_P}{V_{\text{mol}}} + \frac{E_H}{V_{\text{mol}}}$$

**Equação 2:** Energia total de coesão em função da energia de vaporização do líquido (HANSEN,2007).

A energia de vaporização ( $\Delta E_{\text{vap}}$ ) é calculada por meio da **Equação 3** que contempla a entalpia de vaporização do líquido (calor latente de vaporização) e um termo  $RT$  (HANSEN, 2007).

$$\Delta E_{\text{vap}} = \Delta H_{\text{vap}} - RT$$

**Equação 3:** Energia de vaporização (HANSEN,2007)

Os parâmetros de Hansen tem sido extensivamente utilizados para seleção de solventes capazes de dissolver um dado composto químico, como polímeros por

exemplo (HANSEN, 2007). Tal seleção é realizada por meio do cômputo do parâmetro de diferença de energias, *RED*, o qual é descrito por meio da **Equação 4**.

$$RED = \frac{R_a}{R_0}$$

**Equação 4:** Cálculo do parâmetro de diferença de energias, onde  $R_a$  é a distância calculada entre o solvente e o composto de interesse e  $R_0$  é a distância máxima arbitrada (HANSEN, 2007).

Valores de *RED* menores de 1,0 indicam que o solvente é capaz de dissolver o composto de interesse. Caso o valor seja superior a 1,0 não há dissolução do componente. Para valores iguais ou muito próximos a 1,0 não é possível prever precisamente o comportamento da mistura, ou seja, se ocorrerá dissolução ou não.

$R_a$  é a distância calculada entre o solvente e composto de interesse no espaço de parâmetros de solubilidade (**Equação 5**), enquanto que  $R_0$  é a distância máxima arbitrada (HANSEN, 2007). Na **Equação 5**, os subscritos 1 e 2 indicam o solvente e o composto de interesse respectivamente.

$$(R_a)^2 = 4 \cdot (\delta D_2 - \delta D_1)^2 + (\delta P_2 - \delta P_1)^2 + (\delta H_2 - \delta H_1)^2$$

**Equação 5:** Cálculo da distância entre o solvente e o composto de interesse

O parâmetro  $R_0$  é determinado experimentalmente por meio de ensaios de solubilidade entre o composto de interesse e solventes com diversas polaridades. Nos casos em que o dado experimental não está disponível, recomenda-se o uso de um valor aproximado como  $R_0 = 10$  (HANSEN, 2007).

#### 4. Material e Métodos

Para alcançar o objetivo do projeto, foi necessário preparar as amostras, e analisá-las tanto pelo método de referência (espectroscopia na região do infravermelho, método EN 14078) quanto pelo método proposto CLAE-FN-IR.

#### 4.1 O biodiesel B100, o óleo vegetal e o óleo diesel

O biodiesel B100 utilizado no preparo das amostras deste projeto foi fornecido pela ANP. O óleo vegetal utilizado nesse projeto foi o óleo de soja refinado da marca Soya. O óleo diesel utilizado no preparo das amostras deste projeto foi um óleo diesel tipo A S50 (sem biodiesel e com teor de enxofre de até 50 mg.kg<sup>-1</sup>) obtido direto da refinaria junto a Petrobrás.

#### 4.2 Preparo das amostras ternárias de óleo diesel, biodiesel e óleo vegetal

Para a confecção da primeira curva analítica foram preparadas 18 amostras contendo 6 concentrações conhecidas variadas de óleo diesel, biodiesel e óleo de soja (5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30% volumétrica), conforme descrito na **Tabela 3**. Cada uma das 6 concentrações diferentes foi preparada em triplicata verdadeira (replicatas A, B e C), totalizando 18 amostras.

**Tabela 3.** Composição das amostras de biodiesel:óleo diesel adulteradas com óleo de soja, referentes a primeira curva analítica.

Amostra	% Volumétrica		
	Óleo diesel	Biodiesel	Óleo Vegetal
5A	90	5	5
10A	80	10	10
15A	70	15	15
20A	60	20	20
25A	50	25	25
30A	40	30	30

Para a confecção da segunda curva analítica foram preparadas 15 amostras contendo 5 concentrações conhecidas variadas de óleo diesel, biodiesel e óleo de soja (4%, 6%, 8%, 10% e 12% volumétrica), conforme descrito na **Tabela 4**. Cada uma das 5 concentrações diferentes foi preparada em triplicata verdadeira (replicatas A, B e C), totalizando 15 amostras.

**Tabela 4.** Composição das amostras de biodiesel:óleo diesel adulteradas com óleo de soja, referentes a segunda curva analítica.

Amostra	% Volumétrica		
	Óleo diesel	Biodiesel	Óleo Vegetal
4A	92	4	4
6A	88	6	6
8A	84	8	8
10A	80	10	10
12A	76	12	12

Para a verificação das curvas analíticas foram preparadas 12 amostras de verificação com diferentes concentrações de óleo diesel, biodiesel e óleo de soja, conforme descrito na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Composição das amostras de biodiesel: óleo diesel adulteradas com óleo de soja, para a verificação das curvas analíticas.

Amostra	% Volumétrica		
	Óleo diesel	Biodiesel	Óleo Vegetal
1	87,0	13,0	0,0
2	82,0	18,0	0,0
3	78,0	0,0	22,0
4	73,0	0,0	27,0
5	84,0	8,0	8,0
6	66,0	21,0	13,0
7	93,5	6,5	0,0
8	95,0	5,0	0,0
9	92,5	7,5	0,0
10	81,0	10,5	8,5
11	85,0	8,5	6,5
12	95,5	0,0	4,5

Além das amostras padrão preparadas no presente trabalho, 20 amostras comerciais provenientes de postos de abastecimento de combustíveis foram empregadas para o desenvolvimento do método proposto. Essas amostras foram coletadas entre os anos de 2016 e 2017 em postos revendedores de combustível da região sudeste do país.

#### **4.3 A análise das amostras pelo método de referência (espectroscopia na região do IV – método EN 14078)**

As análises por espectroscopia na região do IV (método EN 14078) foram realizadas nas amostras padrão (amostras empregadas para a construção das curvas analíticas), nas 12 amostras de verificação (amostras preparadas em concentrações distintas das curvas analíticas) e nas 20 amostras comerciais (amostras obtidas em postos revendedores de combustível da região sudeste do país).

A análise foi efetuada inserindo uma pequena quantidade da amostra a ser caracterizada em uma célula de fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ) para obtenção do seu espectro.

A absorvância máxima da banda típica do grupamento carbonila presente tanto em ésteres quanto em acilgliceróis é obtida em torno do comprimento de onda de  $1745\text{ cm}^{-1}$ , sendo a quantificação do teor de biodiesel e/ou óleo vegetal no óleo diesel calculada por meio de uma curva analítica preparada com amostras de referência (EN 14078, 2009).

#### **4.4 A análise das amostras pelo método proposto (cromatografia líquida de alta eficiência)**

As análises por CLAE foram realizadas em um equipamento da ThermoScientific (Massachusetts, EUA), modelo Ultimate 3000, composto por uma bomba quaternária (DionexUltimate 3000), um detector por índice de refração modelo Shodex RI-101e um injetor automático modelo WPS-3000 com alça de amostragem de  $250\ \mu\text{L}$ . Foi utilizada uma coluna HyperClone™ 5 com fase Sílica de  $5\ \mu\text{m}$  de tamanho de partícula e com  $120\ \text{Å}$  de diâmetro de poro. A fase móvel usada foi uma mistura de 90% de *n*-hexano e 10% de metil terc-butil éter (MTBE). A fase móvel foi colocada no ultrassom por 30 minutos antes da utilização. O volume de injeção utilizado foi de  $50\ \mu\text{L}$  e a temperatura do forno utilizada foi de  $40^\circ\text{C}$ .

As análises por CLAE foram realizadas conforme procedimento adaptado de FOGLIA, 2015. As principais adaptações feitas foram a diluição das amostras, o volume de injeção e o detector.

As amostras foram injetadas em duas concentrações distintas: 5% volumétrica ( $50\ \mu\text{L}$  da mistura biodiesel:óleo diesel:óleo vegetal e  $950\ \mu\text{L}$  da mistura de 90% *n*-hexano e 10% de MTBE) e 10% volumétrica ( $100\ \mu\text{L}$  da mistura biodiesel:óleo diesel:óleo vegetal e  $900\ \mu\text{L}$  da mistura de 90% *n*-hexano e 10% de MTBE).

## 4.5 A seleção de novas fases móveis a serem empregadas na CLAE-FN-IR utilizando a teoria de Hansen

Buscando otimizar o método desenvolvido por FOGLIA, 2015. Utilizou-se a teoria de Hansen, empregando o software HSPiP versão 4.1.07, para estudar a polaridade de diversos solventes e sua compatibilidade com o *n*-hexano buscando encontrar um substituto mais sustentável para a substituição do MTBE. Os solventes testados foram: acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, metanol, isopropanol, THF, acetonitrila, etanol e acetona.

## 4.6. O tratamento estatístico

### 4.6.1. O teste de Cochran

O teste de Cochran é empregado para verificar se existe diferença entre as variâncias de um determinado grupo de amostras ou não. Neste teste, determinou-se a razão entre a maior variância e a soma de todas as variâncias das amostras, segundo a **Equação 6**.

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2}$$

**Equação 6:** Expressão usada para determinar o valor de  $C_{calculado}$  para o teste de Cochran (MASSART, 1997).

Onde:

$s_{max}^2$  = variância máxima e

$\sum s_i^2$  = somatório de todas as variâncias.

O valor de  $C_{calculado}$  deve ser comparado com o valor de  $C_{tabelado}$  (Anexo C). Se o valor de  $C_{calculado}$  for menor que o valor de  $C_{tabelado}$  conclui-se que trata-se de um

comportamento homocedástico; e se o valor de  $C_{\text{calculado}}$  for maior que o valor de  $C_{\text{tabelado}}$  conclui-se que trata-se de um comportamento heterocedástico.

#### 4.6.2. O teste t-pareado

Com o objetivo de comparar se os resultados obtidos pelo método proposto (CLAE-FN) e o método de referência (espectroscopia na região do IV, método EN 14078) são equivalentes, utilizamos o teste t-pareado. Esse teste é usado justamente para comparar dois grupos de medidas buscando saber se são equivalentes ou não. Nesse trabalho, atribuiu-se um nível de confiança de 95% (HARRIS,2001).

Para realizar o teste, usou-se uma ferramenta no Microsoft Excel chamada de “Teste t: duas amostras em par para médias”. Essa ferramenta recebe os dados a serem comparados e, através de um teste de hipóteses, encontra o  $t_{\text{calculado}}$ . A fórmula utilizada está descrita na **Equação 7**. Onde:  $x_d$  é a média das diferenças,  $s_d$  é o desvio padrão das diferenças e N é o número de pares.

$$t_{\text{calc}} = \frac{x_d \cdot \sqrt{N}}{s_d}$$

**Equação 7.** Expressão usada para obtenção do valor de t calculado para o teste t-pareado (HARRIS, 2001).

Conhecido o  $t_{\text{calculado}}$ , compara-se este valor com o t de Student tabelado (ver Anexo D). Se o valor de  $t_{\text{calculado}}$  for menor que o valor de  $t_{\text{tabelado}}$  ( $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ ), os resultados são considerados equivalentes e, portanto, os métodos são equivalentes, com 95% de confiança (HARRIS,2001).

#### 4.7. A validação do método

A validação de métodos tem sido exigida cada vez mais no meio científico e também na indústria. Quando dados analíticos não são confiáveis podem gerar riscos ao bom andamento da pesquisa, ou mesmo perdas financeiras. Um processo de

validação bem fundamentado garante, por exemplo, se um método é eficaz frente a outro.

Existem várias normas que regularizam um processo de validação. No Brasil, a ANVISA e o INMETRO respaldam as regras em vigor. As etapas da validação realizadas neste projeto são: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez.

#### 4.7.1 A avaliação da linearidade

A linearidade está associada a quanto um método fornece resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004).

Para avaliar a linearidade do método, construiu-se o gráfico no Microsoft Excel, a partir dos ensaios em função das concentrações conhecidas do analito (biodiesel e/ou óleo vegetal, em % volumétrica) versus a área do analito ( $\mu\text{RIU} \cdot \text{min}$ ) e se verificou a equação da regressão linear (**Equação 8**). Onde: y é a resposta do equipamento e x é a concentração do analito.

$$y = a + b.x$$

**Equação 8.** Equação da reta que relaciona a concentração conhecida e a resposta do método analítico.

Este parâmetro permite estimar a qualidade da curva analítica, o quanto mais próximo de 1,0 o coeficiente de correlação (R), menor a dispersão dos dados experimentais (RIBANI *et al.*, 2004). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2016) um valor acima de 0,90. Para que o método tenha uma boa linearidade, a equação da reta referente a esse gráfico deve ter um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superior a 0,99.

#### 4.7.2 Avaliação do limite de detecção (LD)

O limite de detecção avalia a menor concentração do analito que o método é capaz de identificar. A **Equação 9** foi para a determinação do LD do método analítico.

$$LD = 3,3 \cdot \frac{s}{S}$$

**Equação 9.** Expressão empregada para a determinação do limite de detecção do método analítico (RIBANI *et al.*, 2004).

Onde:  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta (estimativa do desvio padrão do branco) e  $S$  é o coeficiente angular da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

#### 4.7.3A avaliação do limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito presente na amostra, que pode ser quantificada pelo procedimento experimental. A **Equação 10** foi empregada para a determinação do LQ do método analítico.

$$LQ = 10 \cdot \frac{s}{S}$$

**Equação 10.** Expressão empregada para a determinação do limite de quantificação do método analítico (RIBANI *et al.*, 2004).

Onde:  $s$  é a estimativa do desvio padrão do branco e  $S$  é o coeficiente angular da equação da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

#### 4.7.4 A avaliação da exatidão

A exatidão foi expressa através da determinação da recuperação do método. A recuperação,  $R(\%)$ , é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente na porção analítica do material teste, que é passível de ser quantificada (RIBANI *et al.*, 2004).

Para a análise da recuperação foram selecionadas, para cada curva analítica, nove determinações em três concentrações distintas, em triplicata, ao longo da faixa de

trabalho. Foram estas 5%, 20% e 30% volumétrica, para a primeira curva analítica e 4%, 8% e 12% volumétrica para a segunda curva analítica. A recuperação foi então expressa usando a **Equação 11**.

$$R(\%) = \frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} \times 100$$

**Equação 11.** Expressão empregada para a determinação da recuperação do método analítico (INMETRO, 2016).

Onde: o valor observado é a média da concentração experimental da triplicata, e o valor esperado a concentração teórica (INMETRO, 2016).

#### 4.7.5 A avaliação da precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre os ensaios repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Neste trabalho, avaliou-se a precisão do método mediante a determinação da repetibilidade, que foi expressa pela **Equação 12**.

$$CV (\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média}} \times 100$$

**Equação 12:** Expressão empregada para a determinação do coeficiente de variação (CV) do método analítico (INMETRO, 2016).

Para a análise da repetibilidade, da mesma maneira foram selecionadas nove determinações em três concentrações distintas, em triplicata, ao longo da faixa de trabalho. Foram estas 5%, 20% e 30% volumétrica, para a primeira curva analítica e 4%, 8% e 12% volumétrica para a segunda curva analítica. E assim, calculou-se a relação entre o desvio padrão da medida na triplicata e a concentração média determinada (INMETRO, 2016).

#### **4.7.6 A avaliação da robustez**

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar-se praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado (INMETRO, 2016).

A avaliação da robustez de um método não é critério de desempenho obrigatório, visto que ao utilizarmos métodos normatizados ou adaptações de métodos normatizados, já conhecemos as condições que mais influenciam no resultado analítico.

Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança em relação à sua precisão.

Nesse trabalho, a avaliação da robustez foi feita através da mudança de um parâmetro (temperatura) do método proposto. Construiu-se duas curvas analíticas empregando diferentes temperaturas (35°C e 40°C). Aplicou-se o teste de Cochran para avaliar se o comportamento da curva continuava homocedástico depois dessa alteração na temperatura.

Empregou-se uma ferramenta no Microsoft Excel chamada de “Teste t: duas amostras em par para médias”, segundo a equação 7 (item 4.6.2), para a verificação, com 95% de confiança, da igualdade das curvas analíticas estudadas (temperatura de 35°C e 40°C).

### **5. Resultados e Discussão**

#### **5.1 A análise das amostras pelo método de referência (espectroscopia na região do IV – método EN 14078)**

Os resultados obtidos pelo método de referência (espectroscopia na região do IV - método EN 14078), das amostras de biodiesel:óleo diesel adulteradas com óleo de soja, referentes a primeira curva analítica, estão apresentados na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Resultados obtidos pelo método de referência (espectroscopia na região do IV - método EN 14078), das amostras de biodiesel:óleo diesel adulteradas com óleo de soja, referentes a primeira curva analítica.

Amostra	% volumétrica de biodiesel			
	Teórica	Experimental		
		A	B	C
5A	5,0	9,4±0,3*	10,1±0,3*	9,8±0,3*
10A	10,0	19,3±0,3*	19,6±0,3*	19,3±0,3*
15A	15,0	27,4±0,3*	27,6±0,3*	28,3±0,3*
20A	20,0	36,9±0,3*	38,4±0,3*	33,9±0,3*
25A	25,0	48,3±0,3*	48,1±0,3*	44,9±0,3*
30A	30,0	56,2±0,3*	55,7±0,3*	54,3±0,3*

\* Incerteza expandida calculada pelo LABCOM/EQ/UFRJ

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 6** observa-se que o método de referência (EN 14078) não foi capaz de quantificar corretamente o teor de biodiesel em óleo diesel, em amostras adulteradas com óleo vegetal. Todas as amostras adulteradas com 6 diferentes concentrações de óleo de soja (5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30% volumétrica), conforme **Tabela 3**, acusaram um teor de biodiesel superior à concentração teórica das amostras. Isto porque o método de referência baseia-se no fato de que substâncias carboniladas (como os ésteres metílicos de ácidos graxos, componentes majoritários do biodiesel) apresentam absorções características do grupo carbonila (C=O) na região de 1750 cm<sup>-1</sup>. Como a absorção do biodiesel e de grupos que contenham em sua estrutura o grupo carbonila ocorre no mesmo comprimento de onda (em torno de 1750 cm<sup>-1</sup>), o método de referência não é capaz de identificar uma possível adulteração com óleo vegetal em uma mistura biodiesel:óleo diesel. Devido a isso, torna-se necessária a investigação de um método capaz de detectar tais alterações, já que a presença de óleo vegetal na mistura pode causar sérios danos ao sistema automotivo e prejuízos econômicos ao consumidor.

Os resultados obtidos pelo método de referência (espectroscopia na região do IV método EN 14078), das amostras de biodiesel:óleo diesel adulteradas com óleo de soja utilizadas como amostras de verificação (ver **Tabela 5**) da primeira curva analítica estão apresentados na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Resultados obtidos pelo método de referência (espectroscopia na região do IV - método EN 14078), das amostras de verificação referentes a primeira curva analítica.

Amostra	% Volumétrica		
	Teórico Biodiesel	Teórico Óleo	Método Referência (EN 14078)
1	13,0	0,0	13,3±0,3*
2	18,0	0,0	18,5±0,3*
3	0,0	22,0	21,6±0,3*
4	0,0	27,0	22,7±0,3*
5	8,0	8,0	14,7±0,3*
6	21,0	13,0	33,1±0,3*

\* *Incerteza expandida calculada pelo LABCOM/EQ/UFRJ*

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 7** observa-se que o método de referência (EN 14078) foi capaz de quantificar corretamente apenas as amostras 1 e 2, que não foram adulteradas com óleo vegetal. A limitação do método de referência na identificação de adulteração por óleos vegetais é ainda mais nítida nas amostras 3 e 4, constituída apenas por óleo vegetal (22,0 % e 27,0 % volumétrica, respectivamente). Nota-se que estas amostras apresentaram teores elevados de “biodiesel”, pelo método de referência (EN 14078), demonstrando um falso positivo, já que essas amostras não possuem biodiesel. Já as amostras 5 e 6, adulteradas com óleo de soja, acusaram teores de biodiesel superiores as concentrações teóricas das amostras.

Os resultados obtidos pelo método de referência (espectroscopia na região do IV método EN 14078), das amostras de biodiesel:óleo diesel adulteradas com óleo de soja

utilizadas como amostras de verificação (ver **Tabela 5**) da segunda curva analítica estão apresentados na **Tabela 6**.

**Tabela 8.** Resultados obtidos pelo método de referência (espectroscopia na região do IV método EN 14078), das amostras de verificação referentes a segunda curva analítica.

Amostra	% Volumétrica		
	Teórico Biodiesel	Teórico Óleo	Método Referência (EN 14078)
7	6,5	0,0	6,7±0,3*
8	5,0	0,0	5,2±0,3*
9	7,5	0,0	7,5±0,3*
10	10,5	8,5	17,7±0,3*
11	8,5	6,5	13,7±0,3*
12	0,0	4,5	4,6±0,3*

\* *Incerteza expandida calculada pelo LABCOM/EQ/UFRJ*

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 8** observa-se que o método de referência (EN 14078) foi capaz de quantificar corretamente apenas as amostras 7, 8 e 9, que não foram adulteradas com óleo vegetal. A limitação do método de referência na identificação de adulteração por óleos vegetais é ainda mais nítida na amostra 12, constituída apenas por óleo vegetal (4,5% volumétrica). Nota-se que esta amostra apresenta teor elevado de “biodiesel”, pelo método de referência (EN 14078), demonstrando um falso positivo, já que essa amostra não possui biodiesel. Já as amostras 10 e 11, adulteradas com óleo de soja, acusaram teores de biodiesel superiores as concentrações teóricas das amostras.

Os dados apresentados nas **Tabelas 6, 7 e 8** já são capazes de provar a ineficiência do método de referência para quantificar o teor de biodiesel no óleo diesel quando as amostras estão adulteradas com óleo vegetal. Por isso, as amostras referentes a segunda curva analítica (ver **Tabela 4**) não foram analisadas pelo método de referência.

A **Tabela 9** mostra os resultados obtidos a partir da análise de 20 amostras comerciais provenientes de postos de abastecimento pelo método de referência. As amostras de 1-10 foram coletadas no ano de 2016, portanto, o teor volumétrico de biodiesel no óleo diesel estabelecido pela ANP era de 7%. As amostras de 11-20 foram coletadas no ano de 2017 quando o teor volumétrico de biodiesel no óleo diesel estabelecida pela ANP era de 8%. Então, para os padrões anotados pela ANP na época da coleta todas as amostras estão dentro da especificação.

**Tabela 9.** Resultados obtidos pelo método de referência (espectroscopia na região do IV método EN 14078), das amostras comerciais provenientes de postos de abastecimento.

<b>Amostra</b>	<b>Teor volumétrico de Biodiesel no óleo diesel pelo método de referência (EN14078)</b>
1	7,3± 0,3*
2	8,0 ± 0,3*
3	7,5 ± 0,3*
4	7,3 ± 0,3*
5	7,5 ± 0,3*
6	7,3 ± 0,3*
7	7,4 ± 0,3*
8	7,4 ± 0,3*
9	7,4 ± 0,3*
10	7,4 ± 0,3*
11	8,3± 0,3*
12	8,4 ± 0,3*
13	8,4 ± 0,3*
14	8,5 ± 0,3*
15	8,1 ± 0,3*
16	8,2 ± 0,3*
17	8,3 ± 0,3*
18	7,7 ± 0,3*
19	8,2 ± 0,3*
20	8,4 ± 0,3*

\* *Incerteza expandida calculada pelo LABCOM/EQ/UFRJ*

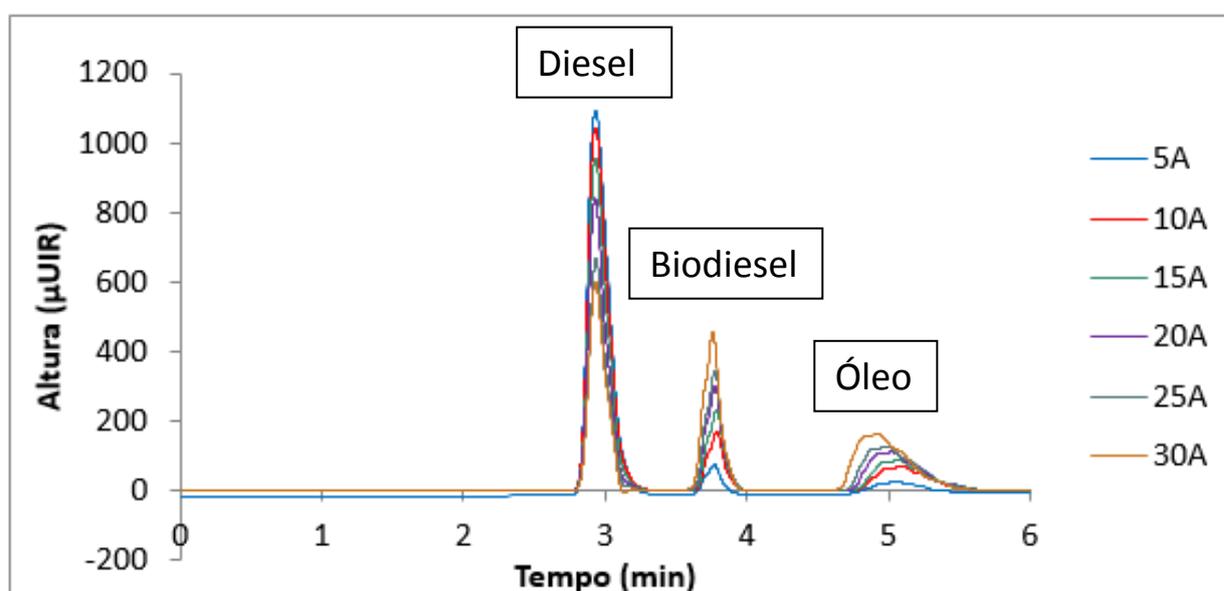
## **5.2 A análise das amostras pelo método proposto (cromatografia líquida de alta eficiência)**

As análises, por CLAE-FN, das amostras padrão (amostras empregadas para a construção das curvas analíticas), das 12 amostras de verificação (amostras preparadas em concentrações distintas das curvas analíticas) e das 20 amostras comerciais obtidas

em postos revendedores foram realizadas conforme procedimento adaptado de FOGLIA, 2015, conforme descrito no item 3.5.2.

### 5.2.1 A análise das amostras padrão (construção da primeira curva analítica)

A **Figura 5** apresenta a sobreposição dos cromatogramas das amostras padrão empregados para a construção da primeira curva analítica. Vale lembrar que as amostras padrão para construção da primeira curva analítica foram injetadas usando a concentração de 5% volumétrica (50  $\mu$ L da mistura biodiesel:óleo diesel:óleo vegetal e 950  $\mu$ L da mistura de 90% *n*-hexano e 10% de MTBE).



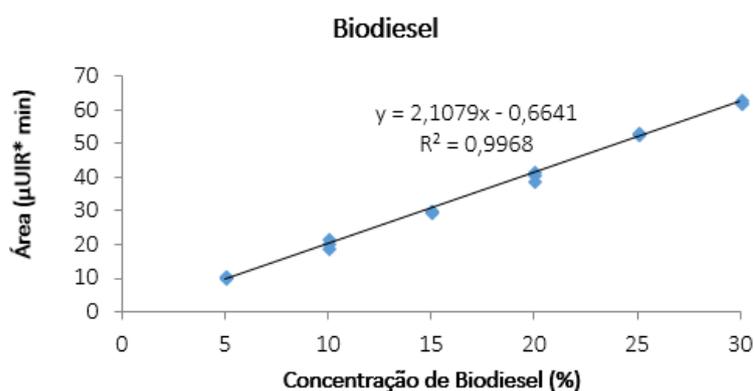
**Figura 5.** Cromatogramas, obtidos por CLAE-FN, das amostras de biodiesel:óleo diesel adulteradas com óleo de soja nas concentrações de 5% a 30% volumétrica.

Nos cromatogramas apresentados na **Figura 5**, é possível ver a nítida separação entre as espécies analisadas (óleo diesel, biodiesel e óleo vegetal) provando a eficiência do método proposto. O primeiro pico (tempo de retenção= 3 min) representa o óleo diesel, o segundo pico (tempo de retenção= 3,8 min) representa o biodiesel e o terceiro pico (tempo de retenção= 5 min) representa o óleo de soja.

A ordem de eluição foi definida através da injeção de amostras puras de óleo diesel, óleo vegetal e biodiesel utilizados neste trabalho utilizando o método proposto.

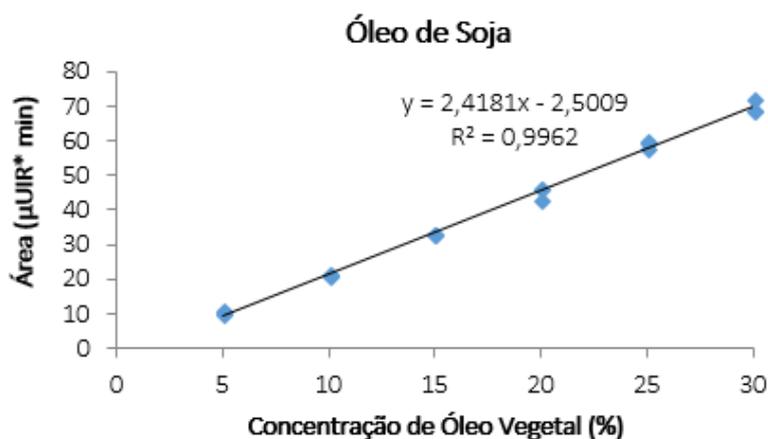
Na **Figura 5** podemos observar além da adulteração da mistura biodiesel:óleo diesel, por óleo vegetal, o aumento gradativo da intensidade dos picos à medida que a concentração do biodiesel (tempo de retenção= 3,8 min) ou óleo vegetal (tempo de retenção= 5 min) aumentam. Desta forma, deve existir uma relação linear entre a concentração do biodiesel e do óleo vegetal e a área ( $\mu\text{RIU} \cdot \text{min}$ ) dos picos. Sendo assim, visando a quantificação do teor de biodiesel no óleo diesel e do óleo vegetal empregado na adulteração da mistura biodiesel:óleo diesel, foram feitas duas curvas analíticas (**Figuras 6 e 7**).

A curva analítica apresentada na **Figura 6** tem como objetivo quantificar o teor do biodiesel no óleo diesel. Para tal foi avaliada a linearidade do segundo pico (tempo de retenção= 3,8 min), apresentado na **Figura 6**.



**Figura 6.** Curva analítica da concentração do biodiesel (% volumétrica) versus área ( $\mu\text{UIR} \cdot \text{min}$ ), na faixa de 5 a 30% volumétrica.

A curva analítica apresentada na **Figura 7** tem como objetivo quantificar o teor de óleo de soja empregado na adulteração da mistura biodiesel:óleo diesel. Para tal foi avaliada a linearidade do terceiro pico (tempo de retenção= 5 min), apresentado na **Figura 7**.



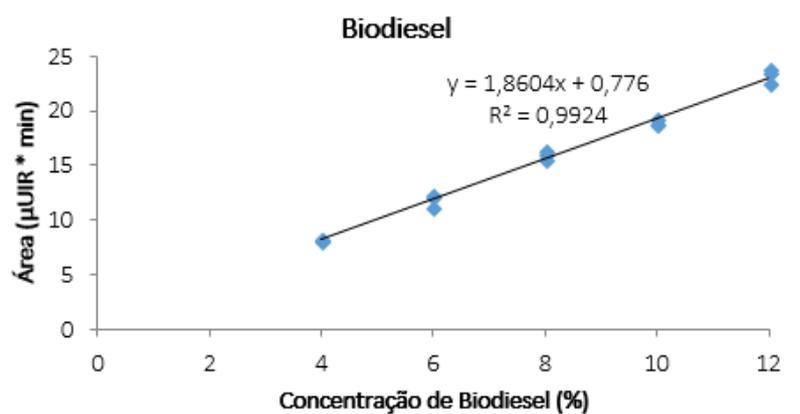
**Figura 7.** Curva analítica da concentração do óleo vegetal (% volumétrica) versus área (µUIR\* min), na faixa de 5 a 30% volumétrica.

O teste de Cochran foi empregado, conforme procedimento descrito no item 4.6.1, página 32, para avaliar se as curvas analíticas apresentadas nas Figuras 6 e 7 possuem ou não um comportamento homocedástico. Estes resultados estão apresentados no item 5.4.1, página 56.

### 5.2.2 A análise das amostras padrão (construção da segunda curva analítica)

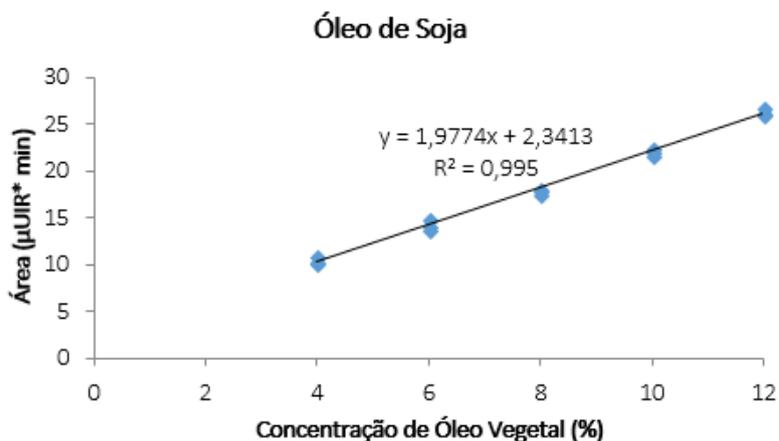
Visando a possível quantificação do teor de biodiesel no óleo diesel e do óleo vegetal empregado na adulteração da mistura biodiesel:óleo diesel, foram feitas duas curvas analíticas (**Figuras 8 e 9**).

A curva analítica apresentada na **Figura 8** tem como objetivo quantificar o teor do biodiesel no óleo diesel.



**Figura 8.** Curva analítica da concentração do biodiesel (% volumétrica) versus área ( $\mu\text{UIR} \cdot \text{min}$ ), na faixa de 4 a 12% volumétrica.

A curva analítica apresentada na **Figura 9** tem como objetivo quantificar o teor de óleo de soja empregado na adulteração da mistura biodiesel:óleo diesel.



**Figura 9.** Curva analítica da concentração do óleo vegetal (% volumétrica) versus área ( $\mu\text{UIR} \cdot \text{min}$ ), na faixa de 4 a 12% volumétrica.

O teste de Cochran foi empregado, conforme procedimento descrito no item 4.6.1, página 32, para avaliar se as curvas analíticas apresentadas nas Figuras 4 e 5 possuem ou não um comportamento homocedástico. Estes resultados estão apresentados no item 5.4.1, página 56.

### 5.2.3 A análise das amostras de verificação

A fim de verificar a eficiência do método, foram feitas seis amostras de verificação para as curvas analíticas na faixa entre 5 e 30% volumétrica e seis amostras de verificação para as curvas analíticas na faixa entre 4 e 12% volumétrica, totalizando 12 amostras padrão de verificação (ver Tabela 5, item 4.2, página 30).

As amostras de verificação de 1 a 6 (ver Tabela 5, item 4.2, página 30) foram analisadas pelas curvas analíticas na faixa entre 5 e 30% volumétrica, representadas nas **Figuras 6 e 7**. Os resultados da comparação entre o método de referência (espectroscopia na região do IV - método EN 14078) e o método proposto (CLAE-FN) estão apresentados na **Tabela 10**.

**Tabela 10.** Comparação dos resultados obtidos da análise das amostras de verificação de 1 a 6 (referentes a primeira curva analítica) por espectroscopia na região do IV - método EN 14078, e pelo método proposto (CLAE-FN).

Amostra	% Volumétrico				
	Teórico Biodiesel	Teórico Óleo	Método Referência (EN 14078)	Método Proposto (Biodiesel)	Método Proposto (Óleo)
1	13,0	0,0	13,3±0,3**	12,9±1,4*	< LD
2	18,0	0,0	18,5±0,3**	17,9±0,7*	< LD
3	0,0	22,0	21,6±0,3**	< LD	21,6±1,6*
4	0,0	27,0	22,7±0,3**	< LD	27,5±1,9*
5	8,0	8,0	14,7±0,3**	8,2±2,5*	8,1±1,5*
6	21,0	13,0	33,1±0,3**	20,6±1,9*	12,7±2,3*

\* Erro relativo; \*\* Incerteza expandida calculada pelo LABCOM/EQ/UFRJ, LD: Limite de detecção

Como já citado na pág30, durante a discussão dos resultados referente a Tabela 5, vemos que o método de referência (EN 14078) não é capaz de quantificar corretamente o teor de biodiesel no óleo diesel em amostras que apresentam óleo vegetal em sua composição, indicando um teor de biodiesel maior que o real devido ao falso positivo gerado pelo óleo vegetal. Já o método proposto (CLAE-FN) foi capaz de quantificar corretamente o teor de biodiesel e de óleo vegetal de todas as 6 amostras de verificação analisadas, demonstrando, portanto, a eficiência do método, em comparação ao método de referência (EN 14078). Além disso, o método proposto foi capaz de quantificar inclusive o teor do adulterante (óleo vegetal) utilizado na amostra.

As amostras de verificação de 7 a 12 (ver Tabela 5, item 4.2, página 30) foram analisadas pelas curvas analíticas na faixa entre 4 e 12 % volumétrica, representadas nas **Figuras 8 e 9**. Os resultados da comparação entre o método de referência (espectroscopia na região do IV - método EN 14078) e o método proposto (CLAE-FN) estão apresentados na **Tabela 11**.

**Tabela 11.** Comparação dos resultados obtidos da análise das amostras de verificação de 7 a 12 (referentes a segunda curva analítica) por espectroscopia na região do IV, pelo método EN 14078, e pelo método proposto (CLAE-FN).

Amostra	% Volumétrico				
	Teórico Biodiesel	Teórico Óleo	Método Referência (EN 14078)	Método Proposto (Biodiesel)	Método Proposto (Óleo)
7	6,5	0,0	6,7±0,3**	6,5±1,0*	< LD
8	5,0	0,0	5,2±0,3**	4,9±0,8*	< LD
9	7,5	0,0	7,5±0,3**	7,4±1,0*	< LD
10	10,5	8,5	17,7±0,3**	10,6±0,6*	8,7±0,5*
11	8,5	6,5	13,7±0,3**	8,2±0,5*	6,2±0,3*
12	0,0	4,5	4,4±0,3**	< LD	4,6±0,3*

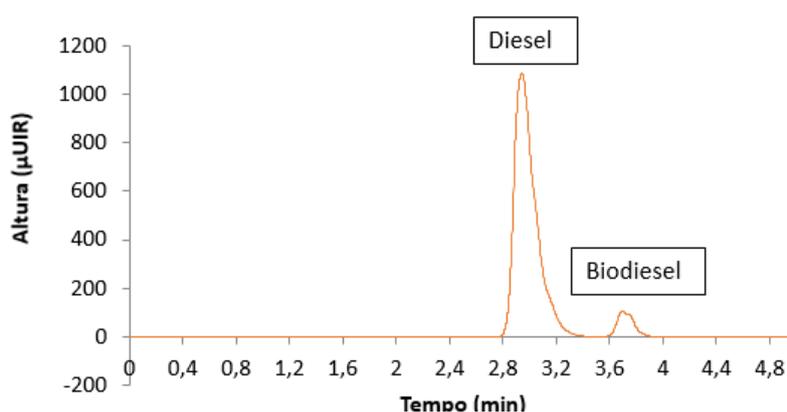
\* 2\* desvio padrão; \*\* Incerteza expandida calculada pelo LABCOM/EQ/UFRJ, LD: Limite de detecção

Como discutido também nos dados referentes a **Tabela 8**, na **Tabela 11** observou-se que o método de referência foi capaz de quantificar com exatidão o teor de biodiesel no óleo diesel apenas das amostras que não apresentam o óleo vegetal em sua mistura. A deficiência do método em determinar com exatidão esse teor fica mais evidente na amostra 12, uma vez que não há biodiesel na amostra e o método de referência indica que há um teor de 4,5% volumétrico de biodiesel no óleo diesel. Já o método proposto (CLAE-FN) foi capaz de quantificar corretamente o teor de biodiesel e de óleo vegetal de todas as 6 amostras de verificação analisadas, além de conseguir quantificar de forma eficaz o teor de óleo vegetal no óleo diesel, demonstrando, portanto, a eficiência do método, em comparação ao método de referência (EN 14078).

#### 5.2.4 A análise das amostras provenientes de postos de combustível

A **Figura 10** apresenta o cromatograma de uma amostra proveniente de um posto revendedor de combustível da região sudeste do país. O primeiro pico (tempo de retenção= 3 min) representa o óleo diesel e o segundo pico (tempo de retenção= 3,8 min) representa o biodiesel. Vale lembrar que todas as amostras provenientes de postos

de combustível analisadas no presente trabalho apresentaram o mesmo perfil cromatográfico apresentado na **Figura 10**. Desta forma, a ausência de pico na região dos 5 minutos indica que todas as amostras analisadas não estavam adulteradas com óleos vegetais.



**Figura 10.** Cromatograma, obtido por CLAE-FN, de uma amostra de biodiesel:óleo diesel proveniente de um posto revendedor de combustível da região sudeste do país.

A quantificação do teor de biodiesel no óleo diesel, nas 20 amostras provenientes de postos de combustível analisadas no presente trabalho, foi feita mediante a utilização das duas curvas analíticas (**Figura 6 e 8**). As amostras de 1 a 10 foram coletadas no ano de 2016, portanto, o teor de biodiesel no óleo diesel vigente era de 7% volumétrico e as amostras de 11 a 20 foram coletadas em 2017, portanto, o teor de biodiesel no óleo diesel vigente era de 8% volumétrico. Os resultados obtidos a partir da curva analítica na faixa de 5 a 30% volumétrica, apresentada na **Figura 6**, encontra-se na **Tabela 12**.

**Tabela 12.** Comparação dos resultados obtidos, da análise de 10 amostras provenientes de postos de combustível por espectroscopia na região do IV (método EN 14078) e pelo método proposto, a partir da curva analítica na faixa de 5 a 30% volumétrica.

Amostra	Teor Volumétrico de biodiesel no óleo diesel (%)		
	Método Referência (IV)*	Método Proposto (CLAE)	Erro Relativo (%)**
1	7,3± 0,3*	7,3	0,3
2	8,0 ± 0,3*	7,7	4,2
3	7,5 ± 0,3*	7,4	2,1
4	7,3 ± 0,3*	7,0	3,8
5	7,5 ± 0,3*	7,4	0,6
6	7,3 ± 0,3*	7,3	0,4
7	7,4 ± 0,3*	7,2	2,2
8	7,4 ± 0,3*	7,4	0,4
9	7,4 ± 0,3*	7,0	5,3
10	7,4 ± 0,3*	7,4	0,7

\*Incerteza expandida calculada pelo LABCOM/EQ/UFRJ; \*\*Erro relativo (%)

Os resultados obtidos a partir da curva analítica na faixa de 4 a 12% volumétrica, apresentada na **Figura 8**, encontra-se na **Tabela 13**.

**Tabela 13.** Comparação dos resultados obtidos, da análise de 20 amostras provenientes de postos de combustível por espectroscopia na região do IV (método EN 14078) e pelo método proposto, a partir da curva analítica na faixa de 4 a 12% volumétrica.

Amostra	Teor Volumétrico de biodiesel no óleo diesel (%)	
	Método Referência (IV)*	Método Proposto (CLAE)
1	7,3± 0,3*	7,3 ± 0,4**
2	8,0 ± 0,3*	7,8 ± 0,6**
3	7,5 ± 0,3*	7,4 ± 0,6**
4	7,3 ± 0,3*	7,2 ± 0,6**
5	7,5 ± 0,3*	7,4 ± 0,2**
6	7,3 ± 0,3*	7,3 ± 0,3**
7	7,4 ± 0,3*	7,4 ± 0,4**
8	7,4 ± 0,3*	7,2 ± 0,5**
9	7,4 ± 0,3*	7,0 ± 0,7**
10	7,4 ± 0,3*	7,2 ± 0,7**
11	8,3± 0,3*	8,3 ± 0,4**
12	8,4 ± 0,3*	8,5 ± 0,4**
13	8,4 ± 0,3*	8,5 ± 0,1**
14	8,5 ± 0,3*	8,5 ± 0,3**
15	8,1 ± 0,3*	8,2 ± 0,1**
16	8,2 ± 0,3*	8,2 ± 0,1**
17	8,3 ± 0,3*	8,3 ± 0,4**
18	7,7 ± 0,3*	7,6 ± 0,3**
19	8,2 ± 0,3*	8,2 ± 0,4**
20	8,4 ± 0,3*	8,4 ± 0,5**

\*Incerteza expandida calculada pelo LABCOM/EQ/UFRJ; \*\* 2\*desvio padrão

Analisando os dados apresentados nas **Tabelas 12 e 13** é possível perceber que o método proposto (CLAE) é capaz de encontrar resultados do teor volumétrico de biodiesel no óleo diesel similares ao método de referência (IV). Vemos, também, que as mesmas amostras apresentam resultados iguais quando utilizadas as diferentes curvas representadas nas Figuras 6 e 8. Acreditando que, devido a menor faixa de análise, a

curva analítica representada na **Figura 8** estaria mais perto da realidade, ela foi utilizada para quantificar um maior número de amostras.

Foi realizado um teste estatístico para avaliar se os resultados encontrados nas **Tabelas 11 e 12** podem ser considerados estatisticamente semelhantes aos resultados encontrados pelo método de referência. Estes resultados estão apresentados no item 5.5, página 65.

### **5.3 A seleção de novas fases móveis a serem empregadas na CLAE-FN-IR utilizando a teoria de Hansen**

Empregou-se a teoria de Hansen para estudar possíveis solventes substitutos ao MTBE, empregado no presente trabalho. Foram avaliados como possíveis substitutos do MTBE como fase móvel, seis solventes: metanol, etanol, isopropanol, THF, acetonitrila e acetona. Inicialmente utilizamos o software HSPiP versão 4.1.07 para nos dizer qual a porcentagem volumétrica a ser utilizada na mistura com *n*-hexano para atingir o mesmo grau de polaridade obtido com a mistura de 10% MTBE em *n*-hexano. Os dados utilizados no Hansen para cada um desses solventes estão apresentados na **Tabela 14**.

**Tabela 14.** Dados dos parâmetros de Hansen dos solventes *n*-hexano, MTBE, acetona, metanol, etanol, isopropanol, THF e acetonitrila

<b>Dados dos Parâmetros de Hansen</b>			
	$\delta_D^*$	$\delta_P^{**}$	$\delta_H^{***}$
<i>n</i> -hexano	14,9	0	0
MTBE	14,3	3,8	3,1
Acetona	15,5	10,4	7
Metanol	14,7	12,3	22,3
Etanol	15,8	8,8	19,4
Isopropanol	15,8	6,1	16,4
THF	16,8	5,7	8
Acetonitrila	15,3	18	6,1

*\*Interações apolares \*\*interações polares \*\*\*ligações de hidrogênio*

O software Hansen compara os valores apresentados na **Tabela 14** e ajusta a proporção da mistura do solvente proposto com o *n*-hexano até que se obtenha a menor diferença das contribuições de energia possível coesivas (RED) entre os dois solventes possível, como explicado no item 4.5 página 32 da revisão bibliográfica. Os valores encontrados com essa aproximação estão apresentados nas **Tabelas 15 a 20**.

**Tabela 15.** Dados dos parâmetros de Hansen da mistura 10% MTBE e 90% *n*-hexano em volume

<b>10% MTBE em <i>n</i>-hexano</b>				
	$\delta_D^*$	$\delta_P^{**}$	$\delta_H^{***}$	%
MTBE	14,3	3,8	3,1	10,00%
<i>n</i> -hexano	14,9	0	0	90,00%
Mistura	14,84	0,38	0,31	

*\*Interações apolares \*\*interações polares \*\*\*ligações de hidrogênio*

**Tabela 16.** Dados dos parâmetros de Hansen da mistura Metanol em *n*-hexano

<b>Metanol em <i>n</i>-hexano</b>				
	$\delta_D^*$	$\delta_P^{**}$	$\delta_H^{***}$	%
Metanol	14,7	12,3	22,3	1,79%
<i>n</i> -hexano	14,9	0	0	98,21%
Mistura	14,90	0,22	0,40	

*\*Interações apolares \*\*interações polares \*\*\*ligações de hidrogênio*

**Tabela 17.** Dados dos parâmetros de Hansen da mistura Etanol em *n*-hexano

<b>Etanol em <i>n</i>-hexano</b>				
	$\delta_D^*$	$\delta_P^{**}$	$\delta_H^{***}$	%
Etanol	15,8	8,8	19,4	2,00%
<i>n</i> -hexano	14,9	0	0	98,00%
Mistura	14,92	0,18	0,39	

*\*Interações apolares \*\*interações polares \*\*\*ligações de hidrogênio*

**Tabela 18.** Dados dos parâmetros de Hansen da mistura Isopropanol em *n*-hexano

<b>Isopropanol em <i>n</i>-hexano</b>				
	$\delta_D^*$	$\delta_P^{**}$	$\delta_H^{***}$	%
Isopropanol	15,8	6,1	16,4	2,32%
<i>n</i> -hexano	14,9	0	0	97,68%
Mistura	14,92	0,14	0,38	

*\*Interações apolares \*\*interações polares \*\*\*ligações de hidrogênio*

**Tabela 19.** Dados dos parâmetros de Hansen da mistura THF em *n*-hexano

<b>THF em <i>n</i>-hexano</b>				
	$\delta_D^*$	$\delta_P^{**}$	$\delta_H^{***}$	%
THF	16,8	5,7	8,0	3,78%
<i>n</i> -hexano	14,9	0	0	96,22%
Mistura	14,97	0,21	0,30	

*\*Interações apolares \*\*interações polares \*\*\*ligações de hidrogênio*

**Tabela 20.** Dados dos parâmetros de Hansen da mistura Acetonitrila em *n*-hexano

<b>Acetonitrila em <i>n</i>-hexano</b>				
	$\delta_D^*$	$\delta_P^{**}$	$\delta_H^{***}$	%
Acetonitrila	15,3	18	6,1	2,39%
<i>n</i> -hexano	14,9	0	0	97,61%
Mistura	14,91	0,43	0,14	

Todas as proporções de mistura solventes apresentadas nas **Tabelas 15 a 20** foram testadas por CLAE-FN e os cromatogramas estão apresentados no **Apêndice A**. A partir destes cromatogramas foi possível observar que nenhuma das misturas de solventes testadas apresentou resultado melhor, em termos de resolução analítica, que a mistura MTBE:*n*-hexano.

No caso da acetona, foi possível obter uma curva analítica com boa linearidade, porém o pico do solvente (acetona) indicado pelo detector UV é na mesma região onde aparecem os triacilgliceróis (tempo de retenção em torno de 5 minutos). Esse fato inviabiliza a utilização desta mistura para o trabalho proposto, uma vez que, em caso de uma adulteração com óleo vegetal na mistura biodiesel:óleo diesel em uma baixa proporção, o pico referente ao solvente iria mascarar esse resultado.

A fase móvel feita de *n*-hexano com metanol, etanol não foi capaz de separar os compostos de interesse (óleo diesel, biodiesel e óleo vegetal) uma vez que não foi possível identificar esses três picos separados e seus tempos de retenção.

Nos casos da utilização de acetonitrila na fase móvel houve a detecção de vários picos aglomerados, ou seja, o método não seria seletivo para os três compostos de interesse de forma clara. A quantidade de picos dificulta a identificação precisa do óleo diesel, biodiesel e óleo vegetal, inviabilizando a utilização desta fase móvel no método proposto.

Na utilização do THF na fase móvel a especificidade foi melhor do que as encontradas nas misturas onde utilizou-se os álcoois, porém os resultados ainda não foram satisfatórios. Essa fase móvel foi capaz de separar a amostra de forma a identificar os 3 compostos de interesse, porém foram obtidos mais de 3 picos, o que dificulta a

integração. Além disso, a resolução analítica encontrada não é tão satisfatória e a sensibilidade para o óleo vegetal ficaria comprometida.

Na utilização do acetato de etila na fase móvel houve a identificação dos tempos de retenção de cada um dos três componentes da amostra porém o pico referente ao solvente está entre o óleo diesel e o biodiesel, tornando complicada a integração desse ponto de forma padrão em todas as amostras a fim de criar a curva analítica. Além disso, a resolução não é tão boa devido a aparição de vários picos ao invés de apenas 3 como desejado inicialmente.

Na utilização do clorofórmio ou diclorometano na fase móvel não houve uma clara separação entre os 3 picos de forma que não foi possível identificar os tempos de retenção corretos levando a uma integração, analiticamente, incorreta. Pequenas alterações foram feitas nas proporções da mistura buscando separar melhores esses 3 picos, porém, não foi obtido sucesso.

Já na utilização do isopropanol na fase móvel também não foi possível a detecção dos 3 componentes. Os dois primeiros picos, correspondentes ao óleo diesel e a biodiesel, respectivamente, não são separados de forma satisfatória e o terceiro pico é o pico referente ao solvente, ou seja, o terceiro composto de interesse (óleo vegetal) não foi detectado o que inviabiliza a utilização dessa fase móvel para o método proposto.

Dessa forma, viu-se que dentre os solventes testados, mesmo com sua toxicidade, a mistura MTBE:*n*-hexano, ainda é a única capaz de identificar o óleo diesel, o biodiesel e o óleo vegetal em uma mistura com os três componentes de forma clara e satisfatória.

## 5.4 A validação do método

### 5.4.1 A avaliação da linearidade

A linearidade do método proposto foi avaliada através da determinação do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). O teste de Cochran foi empregado para verificar o caráter homocedástico (homogeneidade das variâncias) das curvas analíticas (**Figuras 6, 7, 8 e 9**).

As equações da reta, os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), Cochran calculado e Cochran tabelado das equações das curvas analíticas estudadas no presente trabalho (**Figuras 6, 7, 8 e 9**) estão apresentados na **Tabela 21**.

**Tabela 21.** Resultados da equação da reta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), valor de Cochran calculado e tabelado das curvas analíticas.

Equação da Reta	Figura	Coeficiente de Determinação ( $R^2$ )	Valor de Cochran calculado	Valor de Cochran tabelado
$y=2,1079x - 0,6641$	Figura 6	0,9968	0,545	0,6161
$y=2,4181x - 2,5009$	Figura 7	0,9962	0,439	0,6161
$y=1,8604x + 0,776$	Figura 8	0,9924	0,388	0,6838
$y=1,9774x + 2,3413$	Figura 9	0,9950	0,379	0,6838

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 21** foi possível observar que os valores de  $C_{\text{calculado}}$  para todas as curvas analíticas possuem valor menor que o  $C_{\text{tabelado}}$  (95% de confiança), ver Anexo D, considerando número de replicatas ( $n=3$ ) e o número de concentrações na curva ( $k=5$  e  $k=6$ ). Sendo assim, as variâncias apresentaram comportamento homocedástico. É importante ressaltar que qualquer método quantitativo que siga um modelo de regressão linear deve apresentar uma curva analítica na qual as

variâncias, obtidas para cada concentração distinta da reta, apresentem valores significativamente constantes (homogeneidade das variâncias ou homocedasticidade).

Como todas as curvas analíticas (**Figuras 6, 7, 8 e 9**) apresentaram comportamento homocedástico, por meio da aplicação do teste de Cochran, foi possível empregar o método dos mínimos quadrados para a construção das curvas analíticas e obtenção dos coeficientes do modelo (coeficiente linear, angular e de determinação,  $R^2$ ).

Podemos perceber, a partir dos resultados apresentados na **Tabela 21**, que as quatro curvas analíticas estudadas (**Figuras 6, 7, 8 e 9**) apresentaram valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superior a 0,99, indicando uma boa linearidade entre as variáveis estudadas. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) expressa a relação de x e y, assim quanto mais próximo de 1,0, maior a probabilidade de haver uma relação linear definida (LEITE, 2008). Desta forma, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão (RIBANI, 2004). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2016) um valor acima de 0,90. De acordo com INMETRO (2016), a linearidade de um método não deve ser avaliada somente por meio do gráfico dos resultados de resposta em função da concentração, é preciso verificar a ausência de valor aberrante, assim como a igualdade das variâncias dos dados.

#### **5.4.2 A avaliação do limite de detecção**

A partir da **Equação 9**, apresentada no item 4.7.2, foi calculado o limite de detecção do método proposto para a determinação do teor de biodiesel no óleo diesel e do teor de óleo vegetal (possível adulteração) por CLAE-FN utilizando as curvas representadas nas **Figuras 6,7,8 e 9**. Os resultados estão apresentados na **Tabela 22**.

**Tabela 22.** Limite de detecção, em % volumétrica, do método CLAE-FN.

LD (% volumétrica)		
	Figuras 6 e 7	Figuras 8 e 9
Biodiesel	0,07	0,08
Óleo Vegetal	0,06	0,07

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 22** podemos ver que quantidades acima de 0,08 (% volumétrica) de biodiesel e 0,07 (% volumétrica) de óleo vegetal já podem ser detectadas pelo método proposto.

#### 5.4.3 A avaliação do limite de quantificação (LQ)

A partir da **Equação 10**, apresentada no item 4.7.3, foi calculado o limite de quantificação do método proposto para a determinação do teor de biodiesel no óleo diesel e do teor de óleo vegetal (possível adulteração) por CLAE-FN. Os resultados estão apresentados na **Tabela 23**.

**Tabela 23.** Limite de quantificação, em % volumétrica, do método CLAE-FN.

LQ (% volumétrica)		
	Figuras 6 e 7	Figuras 8 e 9
Biodiesel	0,20	0,23
Óleo Vegetal	0,18	0,21

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 23** podemos ver que quantidades acima de 0,23 (% volumétrica) de biodiesel e 0,21 (% volumétrica) de óleo vegetal já podem ser quantificadas pelo método proposto.

#### 5.4.4 A avaliação da exatidão

A partir da **Equação 11**, apresentada no item 4.7.4, foi possível determinar a recuperação do método proposto. Os dados estão apresentados na **Tabela 24**.

**Tabela 24.** Valores da recuperação (%) para o método CLAE-FN.

<b>Analito de quantificação (Figura)</b>	<b>Concentrações</b>	<b>Recuperação (%)</b>
Biodiesel (referente Figura 6)	C1 (5A)	106,2
	C3 (15A)	97,8
	C5 (30A)	100,1
Óleo Vegetal (referente Figura 7)	C1 (5A)	107,0
	C3 (15A)	98,9
	C6 (30A)	99,7
Biodiesel (referente Figura 8)	C1 (4A)	99,8
	C3 (8A)	102,3
	C4 (12A)	100,7
Óleo Vegetal (referente Figura 9)	C1 (4A)	102,6
	C3 (8A)	97,7
	C5 (12A)	101,0

Segundo Lanças (2004) os valores da recuperação devem ser aceitos entre 70% até 120%. As quatro curvas analíticas utilizadas estão dentro desses parâmetros estabelecidos por Lanças(2004). Logo, é possível afirmar que o método possui uma boa recuperação.

#### 5.4.5 A avaliação da precisão

A partir da **Equação 12** apresentada no item 4.7.5, avaliou-se a precisão do método, através da determinação da repetibilidade. Nesse trabalho, utilizamos 3 concentrações diferentes das curvas apresentadas nas **Figura 6, 7, 8 e 9**. Os resultados encontrados estão apresentados na **Tabela 25**.

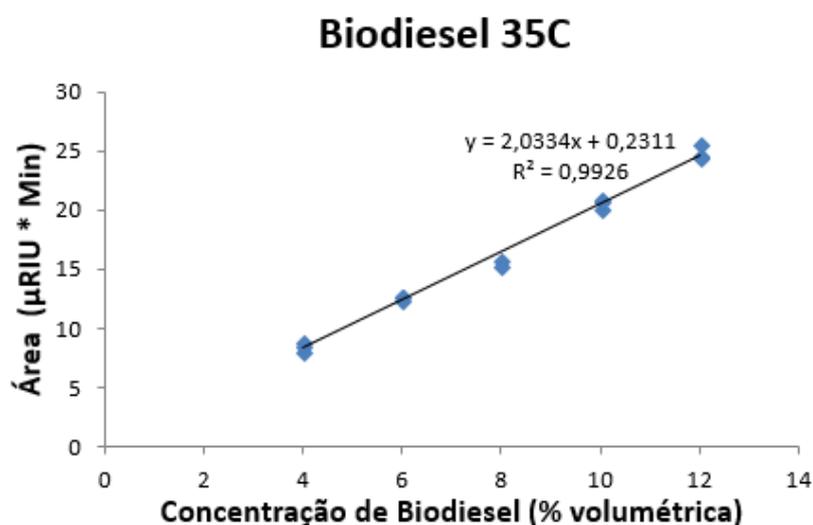
**Tabela 25** Valores do coeficiente de variação (%) do método CLAE-FN.

<b>Analito de quantificação (Figura)</b>	<b>Concentrações</b>	<b>Coeficiente de variação (%)</b>
Biodiesel (referente Figura 6)	C1 (5A)	4,2
	C3 (15A)	3,6
	C5 (30A)	1,4
Óleo Vegetal (referente Figura 7)	C1 (5A)	4,8
	C3 (15A)	3,7
	C6 (30A)	2,8
Biodiesel (referente Figura 8)	C1 (4A)	3,6
	C3 (8A)	3,2
	C4 (12A)	1,3
Óleo Vegetal (referente Figura 9)	C1 (4A)	2,8
	C3 (8A)	3,6
	C5 (12A)	2,9

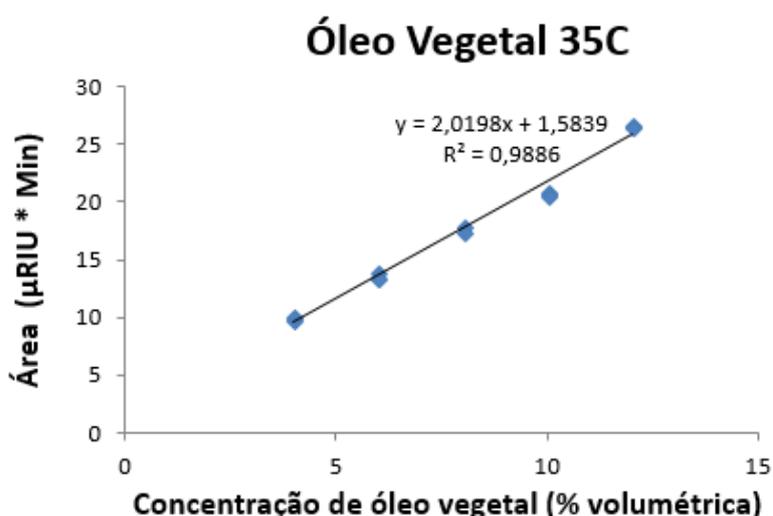
Embora os valores entre as curvas representados na **Tabela 25** tenham variado bastante, todos ficaram abaixo de 5%. Segundo Lanças, 2004, os valores para o coeficiente de variação devem ser inferiores a 5% para serem considerados aceitos. Dessa forma, pode-se dizer que o método proposto tem uma boa repetibilidade.

#### **5.4.6 A avaliação da robustez**

Para avaliar a robustez do método proposto, injetou-se as amostras referentes a curva analítica representada nas **Figura 8 e 9** novamente mudando a temperatura. No método proposto utiliza-se a temperatura do forno de coluna em 40°C. Buscando avaliar a robustez, essa temperatura foi mudada para 35°C. As curvas analíticas obtidas para a avaliação da robustez estão representadas nas **Figuras 11 e 12**.



**Figura 11.** Curva analítica da concentração do biodiesel (% volumétrica) versus área ( $\mu\text{UIR} \cdot \text{min}$ ), na faixa de 4 a 12% volumétrica realizada a 35°C.



**Figura 12.** Curva analítica da concentração do óleo vegetal (% volumétrica) versus área ( $\mu\text{UIR} \cdot \text{min}$ ), na faixa de 4 a 12% volumétrica realizada a 35°C.

Para avaliar se as curvas apresentam comportamento homocedástico, fez-se o teste de Cochran nas duas curvas analíticas representadas nas **Figuras 11 e 12**, e os resultados estão apresentados na **Tabela 26**.

**Tabela 26.** Resultados da equação da reta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), valor de Cochran calculado e tabelado das curvas analíticas.

Equação da Reta	Figura	Coeficiente de Determinação ( $R^2$ )	Valor de Cochran calculado	Valor de Cochran tabelado
$y=2,0334x + 0,2311$	Figura 11	0,9926	0,4982	0,6838
$y=2,0198x + 1,5839$	Figura 12	0,9886	0,4669	0,6838

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 26** foi possível observar que os valores de  $C_{\text{calculado}}$  para todas as curvas analíticas possuem valor menor que o  $C_{\text{tabelado}}$  (95% de confiança), ver Anexo C, considerando número de replicatas ( $n=3$ ) e o número de concentrações na curva ( $k=5$ ). Sendo assim, as variâncias apresentaram comportamento homocedástico.

Empregou-se o teste t-pareado, através de uma ferramenta de análise do software Microsoft Excel chamado de “Teste t: duas amostras em par para médias”, para verificar se os resultados obtidos pelas duas curvas analíticas (**Figuras 8 e 11**) podem ser considerados semelhantes, com 95% de confiança. Os resultados estão apresentados na **Tabela 27**.

**Tabela 27.** Resultados do teste t: duas amostras em par para médias, comparando os resultados obtidos das 5 concentrações, em triplicata, das curvas analíticas realizadas na temperatura de 40°C e 35 °C.

<b>Teste-t: duas amostras em par para médias</b>		
	Variável 1	Variável 2
Média	8,00019	7,9736
Variância	9,299775	9,290533
Observações	14	14
Correlação de Pearson	0,99361	
Hipótese da diferença de média	0	
GI	13	
<b>Stat t</b>	<b>0,288658</b>	
P(T<=t) uni-caudal	0,388697	
t crítico uni-caudal	1,770933	
P(T<=t) bi-caudal	0,777395	
<b>t crítico bi-caudal</b>	<b>2,160369</b>	

Como apresentado na **Tabela 27**, vemos que para a determinação do teor do biodiesel no diesel o método pode ser considerado robusto para uma mudança de temperatura de 40°C para 35°C, com 95% de confiança, uma vez que o valor de  $t_{\text{calculado}}$  (Stat t) é menor que o valor de  $t_{\text{tabelado}}$  (t crítico bi-caudal). Isso nos mostra que para que o método proposto é robusto e não está sujeito a mudanças quando sujeito a pequenas alterações de temperatura.

## 5.5 Emprego do teste t-pareado para a comparação entre o método proposto (CLAE-FN) e o método de referência (espectroscopia na região do IV)

A **Tabela 9** (item 5.1, página 42) apresenta a comparação dos resultados do teor de biodiesel em óleo diesel, em % volumétrica, de 20 amostras comerciais provenientes de postos revendedores de combustível da região sudeste do país, obtidos pelo método de referência (espectroscopia da região do IV) e pelo método proposto (CLAE-FN). Buscando fazer uma análise estatística que compare os resultados (**Tabela 9**) obtidos pelo método proposto (CLAE-FN) e o método de referência (EN 14078), empregou-se o teste t pareado, através de uma ferramenta de análise do software Microsoft Excel chamado de “Teste t: duas amostras em par para médias”. Os resultados do teste t: duas amostras em par para médias, para a comparação dos métodos de referência (EN 14078) e o método proposto (CLAE-FN) estão apresentados na **Tabela 28**.

**Tabela 28.** Resultados do teste t: duas amostras em par para médias, comparando os resultados obtidos das 20 amostras provenientes de postos revendedores de combustível analisados pelo método proposto (CLAE-FN) e pelo método de referência (EN 14078).

<b>Teste-t: duas amostras em par para médias</b>		
	Variável 1	Variável 2
Média	7,85	7,795
Variância	0,2131579	0,292078947
Observações	20	20
Correlação de Pearson	0,9818954	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	19	
<b>Stat t</b>	<b>1,9926462</b>	
P(T<=t) uni-caudal	0,0304323	
t crítico uni-caudal	1,7291328	
P(T<=t) bi-caudal	0,0608646	
<b>t crítico bi-caudal</b>	<b>2,0930241</b>	

*gl: número de graus de liberdade; Stat t: valor de t calculado*

Como apresentado na **Tabela 28**, os resultados obtidos pelo método proposto (CLAE-FN) e o método de referência (EN 14078) podem ser considerados estatisticamente equivalentes, com 95 % de confiança, para a determinação do teor de biodiesel no óleo diesel, uma vez que o valor de  $t_{\text{calculado}}$  (Stat t) é menor que o valor de  $t_{\text{tabelado}}$  (t crítico bi-caudal).

## 6. Conclusões

O método proposto foi capaz de quantificar o teor volumétrico do biodiesel no óleo diesel em misturas biodiesel:óleo diesel e em misturas biodiesel:óleo

diesel:óleo vegetal. Além disso, CLAE-FN-IR foi capaz de identificar a adulteração na amostra com óleo vegetal e quantificar tal alteração.

O método de referência utilizado atualmente pela ANP para o monitoramento da qualidade dos combustíveis não seria capaz de detectar tais alterações o que nos mostra a vantagem do método proposto em relação ao método de referência.

A CLAE-FN mostrou-se também ser um método com boa linearidade, uma vez que apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superior a 0,99 nas quatro curvas utilizadas neste trabalho. Além disso, o método proposto se mostrou robusto, já que não foi sensível a mudança de temperatura de 40°C para 35°C; um método de boa exatidão apresentando valores de recuperação variando de 97,7% a 107,0%. Além disso os valores de LD e LQ encontrados para o biodiesel foram de 0,08 e 0,23 %volumétrica, respectivamente. Os valores de LD e LQ encontrados para o óleo vegetal foram de 0,07 e 0,21 % volumétrica, respectivamente.

O emprego do teste t pareado demonstrou que os resultados obtidos pelo método proposto (CLAE-FN) e o método de referência (EN 14078) são considerados estatisticamente equivalentes, com 95 % de confiança, para a determinação do teor de biodiesel no óleo diesel. Sendo assim, pode-se afirmar que o método proposto é um método simples, rápido e eficaz para a determinação do teor do biodiesel no óleo diesel e identificação de possíveis adulterações por óleos vegetais, se apresentando, portanto, como uma alternativa ao método de referência.

## 7. Perspectivas Futuras

1. Utilizar outros óleos vegetais como canola, milho, girassol, sebo bovino, para adulteração das amostras biodiesel: óleo diesel, a fim de verificar a abrangência do método.
2. Analisar amostras de postos de abastecimento de combustíveis de outros estados a fim de encontrar, possivelmente, alguma adulteração no óleo diesel por óleo vegetal.
3. Estudar nova fase móvel para o método proposto, empregando a teoria de Hansen.
4. Utilizar outros modelos termodinâmicos para buscar uma nova fase móvel.

## 8. Referências

AGARWAL, A. K. **Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines**. Progress in Energy and Combustion Science, v.33, p.233-271, 2007.

Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis – ANP. **Boletim de Qualidade**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Consultado em 14 de março de 2018.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº899, de 29/05/2003.

ALTON, R; ETINKAYA, S; YUCESU, H.S; **The potencial of using vegetable oil fuels as fuel for diesel engines**. Energy Conversion and management. v. 42, p. 529-538, 2001.

ANDRADE, D.F.; MAZZEI, J.L.; d'AVILA, L.A. **Separation of Acylglycerols from Biodiesel by High Performance Liquid Chromatography and SolidPhase Extraction**. Revista Virtual de Química, v.3, p.452-466, 2011.

ANDRADE, D.F.; MAZZEI, J.L.; d'AVILA, L.A. **Separation of Acylglycerols from Biodiesel by High Performance Liquid Chromatography and Solid-Phase Extraction**. Revista Virtual de Química, v.3, p.452-466, 2011.

ANDRADE, D. F. **Caracterização de biodiesel através da separação dos constituintes por cromatografia líquida**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

ARAUJO, M.; **Desenvolvimento de método alternativo para determinação de ésteres totais em biodiesel por CLAE-UV.** Tese de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2017.

ASLISKE, M. A. **Medidas de espectroscopia no infravermelho médio para a determinação do teor de biodiesel em óleo diesel.** Dissertação de M.Sc., Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil 2010.

AVINASH, A; SUBRAMANIAM, D; MURUGESAN, A; **Renewable and Sustainable Energy reviews.** V.29 p.517-527, 2014.

BRANDAO, C.M.; ROSA, L.S.; CORDEIRO, C.I.; VIANA, F.B.; MARTINS, C.R.; VASCONCELOS, A.F.F; MARTINS L.S.P; **Determinação de teor de biodiesel em misturas biodiesel: diesel utilizando espectrofotometria UV-Vis;** 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, 2009.

BROUCK, D.M.D; **Determinação da adulteração de biodiesel, por óleos vegetais, através da cromatografia líquida de alta eficiência.** Monografia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

CAMARA, A.B.F; CARVALHO, L.S; MORAIS, C.L.M; LIMA, L.A.S; ARAÚJO, H.O.M; OLIVEIRA, F.M; LIMA, K.M.G; **MCR-ALS and PLS coupled to NIR/MIR spectroscopies for quantification and identification of adulterant in biodiesel-diesel blends.** Fuel. v.210, p.497-506.

CARDOSO, T.C.; **Separação e isolamento de acilgliceróis do biodiesel por extração em fase sólida (EFS) e caracterização por cromatografia.** Projeto Final de curso, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2012.

CASTRO, B.C.S; **Otimização das Condições da Reação de Transesterificação e Caracterização dos Rejeitos dos Óleos de Fritura e de Peixe para Obtenção de Biodiesel,** Dissertação de M.Sc., Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

CHANDRASEKARAN, V. ARTHANARISAMY, M; NACHIAPPAN, P. DHANAKOTTI, S; MOORTHY, B; **The role of nano additives of biodiesel and diesel blended transportation fuels.** Transportation Research part D, v. 46, p. 145-156, 2016.

CORGOZINHO, C.N.C.; PASA, V.M.D.; BARBEIRA, P.J.S; **Determination of residual oil in diesel oil by spectrofluorimetric and chemometric analysis,** Talanta, v.76, p. 479-484, 2008.

COSTA, R.P.M; **Desenvolvimento de método para determinação do teor de biodiesel em óleo diesel empregando teste colorimétrico e processamento de imagem.** Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2015.

COSTA, R.P.M; KHALIL T.C.; SANTOS, A.P.F.; ANDRADE, D.E.; D'AVILA, L.A., **Determinação do teor de biodiesel em diesel empregando o ensaio colorimétrico do ácido hidroxâmico,** Química Nova, v.38, p.563-569, 2015.

COSTA, P. R. N; ROSSI, L.F.S; ZAGONEL, G;F; RAMOS, L.P; **Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleos de soja usado em frituras.** Química Nova v.4 p 23, 2000.

CZAUDERNA,M.; KOWALCZYK,J. **Separation of some mono-,di- and tri-unsaturated fatty acids containing 18 carbon atoms by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection.** Journal of Chromatography B, v. 760, p. 165-178, 2001.

DEMIRBAS, A; **Importance of biodiesel as transportation fuel.** Energy Policy v. 35 p.4661-4670, 2007.

FAGUNDES, F.P.; SILVA, A. S.; SOUTO, C. R. O.; GARCIA, R. B.; COSTA,M.**Utilização de técnicas espectroscópicas na determinação do percentual de biodiesel em misturas binárias com o diesel.** In; 4º PDPETRO, São Paulo, Out. 2007.

FERRÃO, M. F.; VIEIRA, M. S; PAZOS, R. E. P. P.; FACHINI, D.; GERBASE, A. E.; MARDER,L.**Simultaneous determination os quality parameters of biodiesel/diesel blends using HATR-FTIR spectra and PLS, iPLS or siPLS regressions.** Fuel, v. 90, p-701-706,2011.

FOGLIA, T.A; JONES, K.C; PHILLIPS, J.G; **Determination of biodiesel and Triazylglycerols in diesel fuel by LC.** Chromatographia, v.62 p.115-119, 2005.

GAO, J. **Using Hansen Solubility Parameters (HSPs) to develop antioxidant-packaging film to achieve controlled release.** Dissertação de mestrado, Michigan State University, 2014.

GAYDOU, V; KISTER, J; KISTER, N.D; **Evaluation of multiblock NIR/MIR PLS predictive models to detect adulteration of diesel/biodiesel blends byvegetal oil;** *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*; v.106, p.190–197, 2011.

GONTIJO, L.C.; GUIMARÃES, E.; MITSUTAKE, H.; SANTANA, F.B.; SANTOS, D.Q.; NETO, W.B.; **Quantification of soybean biodiesels in dieselblends according to ASTM E1655 using mid-infrared spectroscopy andmultivariate calibration.** *Fuel*, v.117, p.1111–1114, 2014.

GUARIEIRO, L.L.N; PINTO, A.C; AGUIAR, P.F; RIBEIRO, N.M; **Metodologia analítica para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel: diesel utilizando espectroscopia na região do infravermelho,** Química Nova, v. 31, p.421-426, 2008.

GUARIEIRO, L.L.N; PINTO, A.C; AGUIAR, P.F; RIBEIRO, N.M; **Metodologia analítica para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel: diesel utilizando espectroscopia na região do infravermelho,** Química Nova, v. 31, p.421-426, 2008.

HANSEN, C.M., **Hansen solubility parameters: a user's handbook.** CRC Press, 2007.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa.** 5º Ed. Rio de janeiro: LTC. 2001.

HILDEBRAND, J., R. Scott, **The Solubility of Nonelectrolytes**, Reinhold Publ. Corp, New York, 1950.

HOLCAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER J.; PROKES, B. **Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods**. Journal of Chromatography A, v. 858, p. 13-31, 1999

HOLCAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER J. **Analysis of acylglycerols and methyl esters of fatty acids in vegetable oils and in biodiesel**. Critical Reviews in Analytical Chemistry, v. 31, p. 53-56, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA – INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DQO-CGCRE-008. Revisão 05. 2016. Disponível em: [www.inmetro.gov.br](http://www.inmetro.gov.br). Acessado em: 26/03/2017.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Ed. RiMa. São Carlos. 2004.

LEITE, D.S.S; FERNANDES, T.E.S, **Desenvolvimento de Método para Separação e Identificação de Biodiesel e/ou Óleos Vegetais em BX**, Projeto final de curso, Escola de Química, Universidade federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. Ed. Átomo. São Paulo. 5ªed. 2008.

LUE, Y. F.; YEH, Y. Y.; WU, C. H.; **The emission characteristics of a small D.I. diesel engine using biodiesel blends fuels**. Journal of Environmental Science and Health. V.36 p. 845, 2001.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. **O Estado da Arte da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência**. Química Nova, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MIRANDA, J.L.; MOURA, L.C. **BOA - BIODIESEL - OBTENÇÃO E ANÁLISE DE QUALIDADE**. Rio de Janeiro: Publit Soluções Reditoriais, 7 edição, capítulo 5, 2016.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V.L.C. **“Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel”**. Química Nova, v.32 p. 639-648, 2009.

NARAYAN, C.M; **Vegetable oil as engine fuels-prospect and retrospect proceedings on recent trends in automotive fuels**. Nagpur, India, 2002

PAVIA, D.L., LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**. 3th ed. Thomson Learning, 2001.

PAIVA, E.M; ROHWEDDER, J.J.R; PASQUINI, C; PIMENTEL, M.F.; PEREIRA, C.F; **Quantification of biodiesel and adulteration with vegetable oils in diesel/biodiesel blends using portable near-infrared spectrometer**. Fuel, v.160 p. 57-63, 2015

PRAMANIK K.; **Properties and use of Jatropha curcas oil and diesel fuel blends in compression ignition engine**. Renew Energy v. 28, p 239-48, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L.F.C. **Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos**. Química Nova, v.27, p. 771-780. 2004.

SCATCHARD, G., Wood, S. E., and Mochel, J. M., **Vapor-liquid equilibrium V. Carbontetrachloride-benzenemixtures**, *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 712, 1940.

SCHWAB, A.W.; BAGBY, M.O.; FREEDMAN, B. **Preparation and Properties of Diesel Fuels from Vegetable Oils**. *Fuel*, v.66, p.1372-1378, 1987.

SIDIBÉ, S.S; BLIN, J; VAITILINGOM, G; AZOUMAHM, Y. **Use of crude filtered vegetable oil as a fuel in diesel engines state of the art: Literature review**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* V. 14 ,p. 2748–2759, 2010.

SILVA, M.A.A; BORGES, A.T.D; ANTONIOSI, N.R.F; **Desenvolvimento de ensaio para análise qualitativa de biodiesel em misturas diesel-biodiesel para aplicação em postos revendedores de combustível**. Química nova, v.39, p 100-103, 2016

SUAREZ, P. A.Z.; MENEGHETTI, S. M.P. **Parâmetros físicos químicos para processos de produção de biodiesel**. Brasília. RBTB. 2015.

UDAETA, M.E.M.; BAITELO, R.L.B.; BURNI, G.F.; GRIMONI, J.A.B.; **Comparação da produção de energia com diesel e biodiesel analisando todos os custos envolvidos**, 5º Encontro de energia no meio rural, 2004.

VASCONCELOS, F. V. C. DE; SOUZA JÚNIOR, P. F. B. DE; PIMENTEL, M. F.; PONTES, M. J. C.; PEREIRA, C. F.; **Using Near-Infrared Overtone Regions to Determine Biodiesel Content And Adulteration Of Diesel/Biodiesel Blends With Vegetable Oils**. *Analytica Chimica Acta*, v.716, p.101-107, 2012.

VEMPATAPU, B.P; JANAUIA, P. K; **Monitoring petroleum fuel adulteration A review of analytical methods**. *Trends in Analytical Chemistry* v.92 p.1-11, 2017.

VIEIRA, M.S.; FRANCESQUETT, J.Z; FACHINI, D.; GERBASE, A. E.; FERRÃO, M. F. **Avaliação de adulteração de misturas biodiesel diesel empregando espectroscopia no infravermelho e análise por componentes principais**. *XXVIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção*, São Paulo, 2010.

WERLANG, M.; PAZOS, R.E.P.P.; MARDER, L., SCHNEIDER, R.C.S.; FACHINIC, D.; GERBASE, A.E.; FERRÃO, M.F.; **Aplicação das Transformadas Wavelets em Dados de Espectroscopia no Infravermelho para a Determinação de Biodiesel e Óleo Vegetal em Blendas Biodiesel/Óleo Vegetal/Diesel**. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, v.5, p.242-248, 2013.

YUSUF, N.N.A.N; KAMARUDIN, S.K; YAAKUB, Z; **Energy Conversion and Management**. V.52 p. 2741-2751, 2011

## ANEXO A

### Especificações do biodiesel segundo o regulamento técnico nº 3/2014

#### Regulamento Técnico ANP Nº 3/2014

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1) (2)	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m <sup>3</sup>	850 a 900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viscosidade cinemática a 40°C	mm <sup>2</sup> /s	3,0 a 6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água, máx.	mg/kg	200,0 (3)	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação total, máx.	mg/kg	24	15995	-	EN ISO 12662 (5)
Ponto de fulgor, mín. (4)	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103 (5)
Cinzas sulfatadas, máx. (6)	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	15867	5453	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 (5) EN 14109 (5) EN 14538 (5)
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538 (5)
Fósforo, máx. (7)	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107 (5) EN 16294 (5)
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx. (6)	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número de cetano (6)	-	Anotar	-	613 6890 (8)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	(9)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	EN 14104 (5)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15771 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5) EN 14106 (5)

Glicerol total, máx. (10)	% massa	0,25	15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,70	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110 (5)
Índice de iodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111 (5)
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín. (11)	h	6 (12)	-	-	EN 14112 (5) EN 15751 (5)

Nota:

(1) Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura de ensaio. Em caso de disputa, o produto só poderá ser considerado como não especificado no Aspecto, caso os parâmetros teor de água e/ou contaminação total estejam não conformes.

(2) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade no Aspecto, deverão ser realizadas as análises de teor de água e contaminação total. O produto será reprovado caso pelo menos um desses dois últimos parâmetros esteja fora de especificação.

(3) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade, será admitida variação de +50 mg/kg no limite do teor de água no biodiesel para o produtor e de +150 mg/kg para o distribuidor.

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

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

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

(7) Em caso de disputa, deve ser utilizado o método EN 14107 como referência.

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

(9) Limites conforme Tabela 1a. Para os estados não contemplados na tabela o ponto de entupimento a frio permanecerá 19°C.

(10) Poderá ser determinado pelos métodos ABNT NBR 15908, ABNT NBR 15344, ASTM D6584 ou EN14105, sendo aplicável o limite de 0,25% em massa. Para biodiesel oriundo de material graxo predominantemente láurico, deve ser utilizado método ABNT NBR 15908 ou ABNT NBR 15344, sendo aplicável o limite de 0,30% em massa.

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

(12) A estabilidade à oxidação a 110 °C terá seu limite mínimo de 8 horas, a partir de 1º de novembro de 2014.

## ANEXO B

### Especificações do diesel BX a B30 segundo norma da ANP nº 30/2016

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	MÉTODO	LIMITE		
			S10	S500	S1800 não rodoviário
Aspecto	-	Visual	LII (2)	LII (2)	LII (2)
Cor	-	Visual	(3)	Vermelho (4)	(5)
Cor ASTM, máx	-	NBR 14483 ASTM D6045 ASTM D1500	3,0	3,0	3,0
Massa Específica (20°C)	Kg/m <sup>3</sup>	NBR 7148 NBR 14065 ASTM D1298 ASTM D4052 NBR 15983 ASTM D7042	817,8 a 865,0	817,8 a 875,5	822,4 a 886,0
Viscosidade a 40°C(7)	mm <sup>2</sup> /s	NBR 10441 ASTM D445 ASTM D7279 NBR 15983 ASTM D7042	1,9 A 4,1	2,0 A 5,0	2,0 A 5,0
Teor de Biodiesel % volume	% volume	NBR 15568 EN14078 ASTM D7861 ASTM D7371(9)	8,0	8,0	8,0
Enxofre, máx	mg/kg	ASTM D5453 ASTM D2622 ASTM D7039 ASTM D7220 (9)	10	-	-
Enxofre, máx	mg/kg	ASTM D2622 ASTM D5453 ASTM D7039	-	500	1800
Destilação / 10% vol., máx. (10)	°C	NBR 9619 (9) ASTM D86 (9) ASTM D1160	180	Anotar	Anotar
Destilação / 50% vol. (10)	°C	NBR 9619 (9) ASTM D86 (9) ASTM D1160	245,0 a 295,0	Anotar	Anotar

Destilação / 85% vol. (10)	°C	NBR 9619 (9) ASTM D86 (9) ASTM D1160	Anotar	Anotar	Anotar
Destilação / 90% vol. (10)	°C	NBR 9619 (9) ASTM D86 (9) ASTM D1160	Anotar	Anotar	Anotar
Destilação / 95% vol. (10)	°C	NBR 9619 (9) ASTM D86 (9) ASTM D1160	Anotar	Anotar	Anotar
Ponto de fulgor, °C, mín.	°C	NBR 7974 NBR 14598 ASTM D56 ASTM D93 ASTM D3828	38,0	38,0	38,0
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	NBR 14747 ASTM D6371	11,0	11,0	11,0
Resíduo de Carbono - 10% amostra, máx.	%massa	NBR 14318 ASTM D524	0,25	0,25	0,25
Cinzas, máx.	% massa	NBR 9842 ASTM D482	0,01	0,01	0,01
Corrosividade ao cobre		NBR 14359 ASTM D130	1	1	1
Teor de água, máx.	mg/Kg	ASTM D6304 EN ISO 12937	200	500	500
Água e sedimentos, máx.	% vol	ASTM D2709	-	0,05	0,05
Estabilidade a oxidação	h	EN15751	20	20	20
Contaminação Total, máx. (12)	Mg/Kg	EN12662	24	Anotar	Anotar
Número de acidez, máx	mg KOH/g	NBR 14248 ASTM D664	0,3	0,3	0,3
Condutividade elétrica, mín. (13)	pS/m	ASTM D2624 ASTM D4308	25	25	Anotar (14)
Número de cetano ou número de cetano derivado (NCD), mín.		ASTM D613 ASTM D6890 ASTM D7170 ASTM D7668	48	42	42

## ANEXO C

**Tabela com os valores críticos de Cochran (95% de confiança).**

k \ n	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	∞
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880	0,7341	0,6602	0,5813	0,5000
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025	0,5466	0,4748	0,4031	0,3333
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884	0,4366	0,3720	0,3093	0,2500
5	0,8413	0,6838	0,5931	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118	0,3645	0,3066	0,2513	0,2000
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4194	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568	0,3135	0,2612	0,2119	0,1667
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3299	0,3154	0,2756	0,2278	0,1833	0,1429
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829	0,2462	0,2022	0,1616	0,1250
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568	0,2226	0,1820	0,1446	0,1111
10	0,6020	0,4450	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,0666	0,2541	0,2439	0,2353	0,2032	0,1655	0,1308	0,1000
12	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020	0,1737	0,1403	0,1100	0,0833
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671	0,1429	0,1144	0,0889	0,0667
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303	0,1108	0,0879	0,0675	0,0500
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1246	0,1216	0,1160	0,1113	0,0942	0,0743	0,0567	0,0417
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921	0,0771	0,0604	0,0457	0,0333
40	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713	0,0595	0,0462	0,0347	0,0250
60	0,1737	0,1131	0,0895	0,0765	0,0682	0,0625	0,0583	0,0552	0,0520	0,0497	0,0411	0,0316	0,0234	0,0167
120	0,0998	0,0632	0,0495	0,0419	0,0371	0,0337	0,0312	0,0292	0,0279	0,0266	0,0218	0,0165	0,0120	0,0083
∞	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

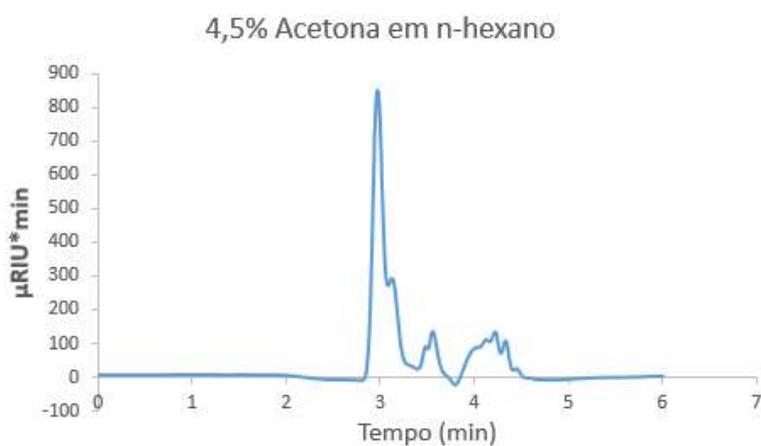
ANEXO D

**Tabela com os valores críticos para o teste t de student (MILLER & MILLER, 1993).**

Valor de t para um intervalo de confiança de	90%	95%	98%	99%
Valor crítico de   t   para valores de P de	0,10	0,05	0,02	0,01
Número de graus de liberdade				
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

ANEXO 5

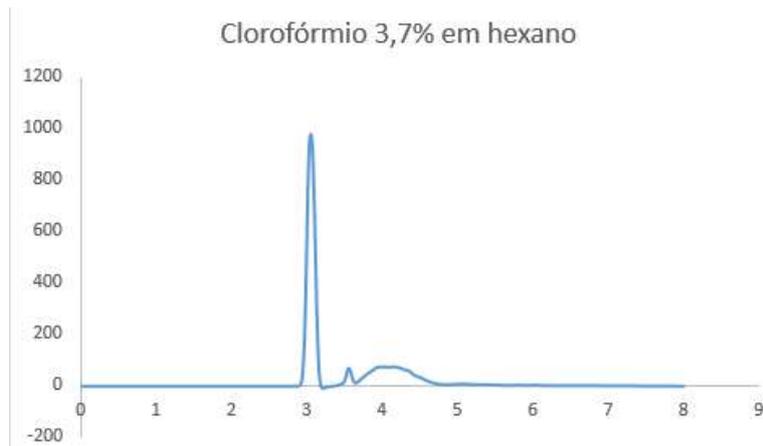
## APÊNDICE A



**Figura 1A.** Cromatograma utilizando fase móvel; 4,5% volumétrico acetona em *n*-hexano na análise de amostra biodiesel: óleo vegetal: óleo diesel.



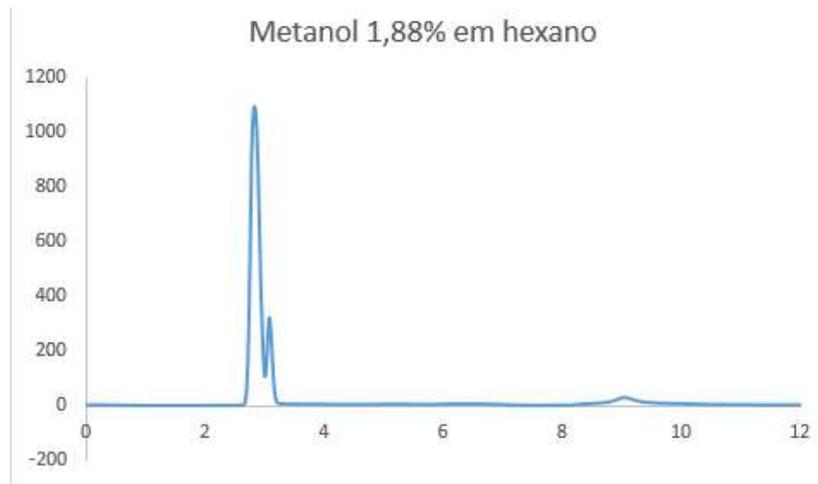
**Figura 1B.** Cromatograma utilizando fase móvel; 5,25% volumétrico de acetato de etila em *n*-hexano na análise de amostra biodiesel: óleo vegetal: óleo diesel.



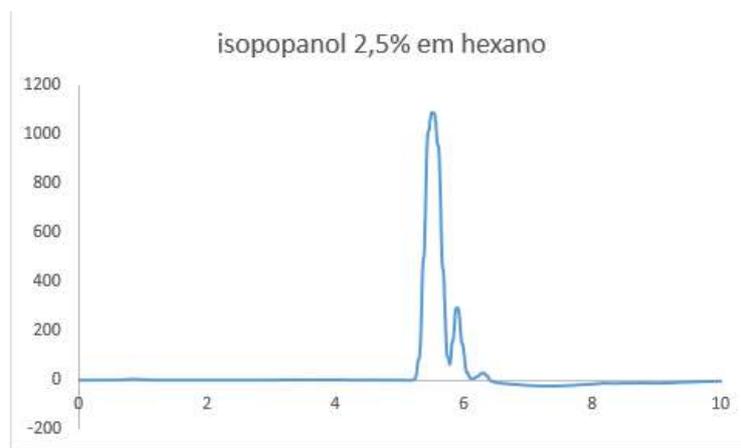
**Figura 1C.** Cromatograma utilizando fase móvel; 3,70% volumétrico de clorofórmio em *n*-hexano na análise de amostra biodiesel:óleo vegetal:óleo diesel.



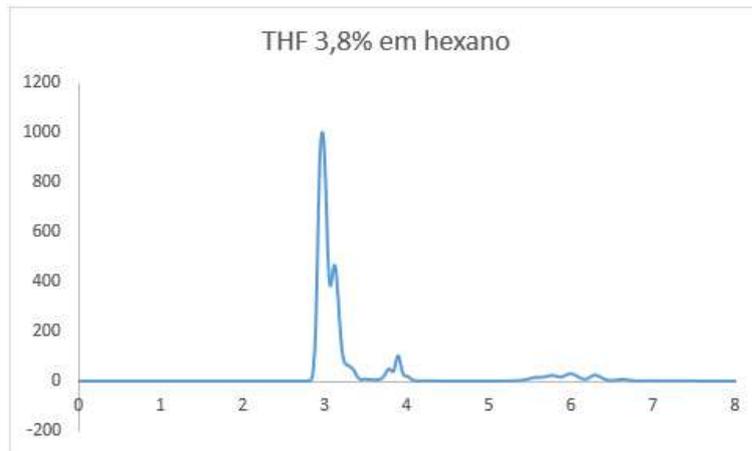
**Figura 1D.** Cromatograma utilizando fase móvel; 3,50% volumétrico de diclorometano em *n*-hexano na análise de amostra biodiesel:óleo vegetal:óleo diesel.



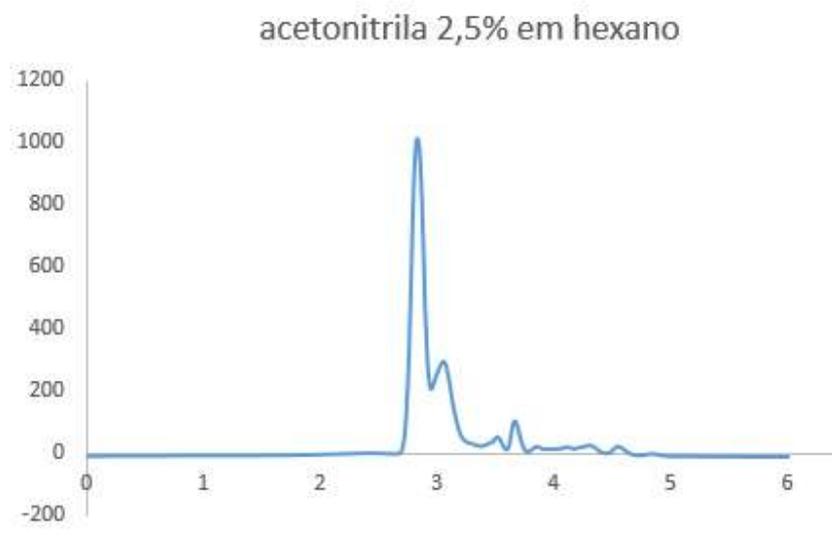
**Figura 1E.** Cromatograma utilizando fase móvel; 1,88% volumétrico de metanol em *n*-hexano na análise de amostra biodiesel:óleo vegetal:óleo diesel.



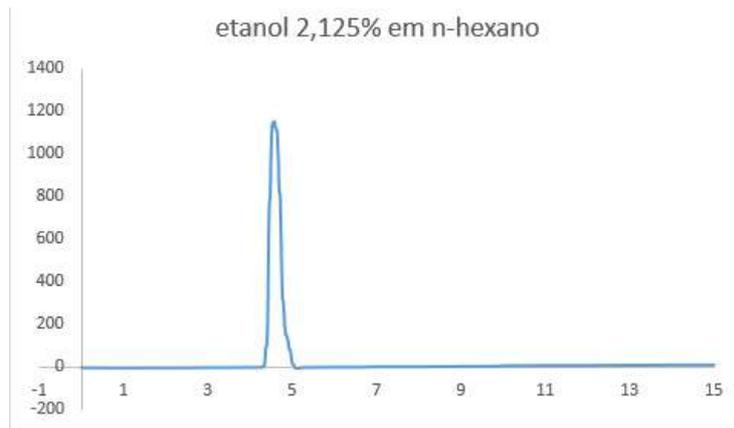
**Figura 1F.** Cromatograma utilizando fase móvel; 2,50% volumétrico de isopropanol em *n*-hexano na análise de amostra biodiesel:óleo vegetal:óleo diesel.



**Figura 1G.** Cromatograma utilizando fase móvel; 3,80% volumétrico de THF em *n*-hexano na análise de amostra biodiesel:óleo vegetal:óleo diesel.



**Figura 1H.** Cromatograma utilizando fase móvel; 2,50% volumétrico de acetonitrila em *n*-hexano na análise de amostra biodiesel:óleo vegetal:óleo diesel.



**Figura 11.** Cromatograma utilizando fase móvel; 2,125% volumétrico de etanol em *n*-hexano na análise de amostra biodiesel: óleo vegetal: óleo diesel.