



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA

INSTITUTO DE QUÍMICA



MARIA LUIZA MARUJO DE ARAUJO

**ANÁLISE DO TEOR DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS NO
BIODIESEL POR CROMATOGRÁFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO**

RIO DE JANEIRO

2024

Maria Luiza Marujo de Araujo

**ANÁLISE DO TEOR DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS NO
BIODIESEL POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de bacharel em Químico
com Atribuições Tecnológicas.

Orientadora: Débora França de Andrade (IQ/UFRJ)
Co-orientador: Luiz Antonio d'Avila (EQ/UFRJ)

RIO DE JANEIRO

2024

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Lucia Marujo, por ser minha maior incentivadora e meu porto seguro, por todo amor em forma de café com pão de queijo para alegrar nossas manhãs. Ao meu pai, Marcelo Brito, por permitir que esse sonho tenha sido realizado e sempre me lembrar da importância do estudo e da minha independência.

Ao meu irmão, Leonardo Marujo, por dividir minhas frustrações e me fazer enxergar a vida de uma forma mais engraçada e leve.

À minha prima e irmã, Marianna Marujo, por ser minha melhor amiga e ser a pessoa que me entende até pelo olhar, não existe ninguém que me conheça como ela.

Aos meus avós maternos, Delfina Marujo e Antônio Marujo (*in memoriam*), e minha avó paterna, Marina Brito, por todo apoio, amor e carinho nessa jornada, e lembrar que a vida é difícil, mas é menos dolorida quando estamos ao lado das pessoas certas.

Ao meu grande amor e companheiro de vida, Vinicius Lacerda, que está comigo antes mesmo de ingressar na universidade e me lembra diariamente o quanto sou capaz e merecedora de tudo que estou conquistando, seu amor e cuidado me fortalecem.

Ao meu Humilde grupo, Guilherme Furtado, Adriana Maciel, Gabriela Ferreira, Julia Concordido, Isabelle Freitas, Bruna Estrela, Juliana Fernandes e Tatiana Medeiros, por estarem comigo desde o primeiro dia da graduação, tornar essa caminhada mais leve e divertida, pelas festas e jogatinas, conversas profundas e piadas de quinta série, pelos choros e as risadas mais sinceras. Quem disse que amizades de primeiro período não duram estava errado, porque tenho vocês para a vida inteira.

Aos meus orientadores, Débora França de Andrade e Luiz Antonio D'Avila, pelos ensinamentos, suporte, paciência, carinho e dedicação, porque nada disso seria possível sem vocês. A ciência precisa de mais professores como vocês.

Às equipes do Laboratório de Combustíveis e Derivados de Petróleo da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LABCOM-EQ/UFRJ) e do Laboratório de Desenvolvimento de Métodos Analíticos e Cromatografia do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LADMAC-IQ/UFRJ), onde encontrei pessoas incríveis e que me ensinaram e deram todo o suporte necessário. Aos colegas de laboratório Daniel Cozendey, Carolina Fendt e Marina Garrido, pela companhia, incentivo e risadas no café da tarde. Em especial, meus mais sinceros agradecimentos a Cristiane Gimenes, que me acolheu e ensinou com todo o seu amor e carinho, quem eu tenho maior admiração e inspiração como profissional.

Aos laboratórios Bioetanol (IQ-COPPE-UFRJ) e Greentec (EQ-UFRJ), por darem todo o suporte necessário para eu dar continuidade no meu projeto e realizar minhas análises.

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (PRH – ANP) e ao Programa Químico de Petróleo e Biocombustíveis (PRH 20.1) pela formação complementar e suporte financeiro.

Aos professores, técnicos e funcionários do Instituto de Química, agradeço pelos ensinamentos e por me permitirem fazer ciência.

RESUMO

O método de referência para a análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) presentes no biodiesel, se baseia na técnica de cromatografia gasosa (CG). O cromatograma por cromatografia gasosa (CG) apresenta um pico para cada espécie de éster presente no biodiesel, necessitando de um analista experiente para integrar e quantificar o analito de interesse. Comparada à técnica de referência, a cromatografia de exclusão por tamanho (CET) apresenta a vantagem de que os ésteres presentes no biodiesel serão representados por um único pico cromatográfico, simplificando a quantificação do analito de interesse. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido por Costa (2022), baseado na cromatografia de exclusão por tamanho (CET), para a determinação do teor de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes em amostras de biodieséis comerciais, e a comparação com o método de referência (CG). A análise por CET empregou tolueno com 0,5% (v/v) de tetrahydrofurano como fase móvel e coluna Phenomenex de dimensões (300 mm x 7,80 mm e fase estacionária Phenogel de 5 µm de tamanho de partícula e com 100 Å de diâmetro de poro), volume de injeção ajustado para 20 µL, detector índice de refração e tempo de corrida de 15 minutos. Para a quantificação dos constituintes, foi construída uma curva analítica com o padrão de oleato de metila e foram empregadas 5 amostras de biodiesel comercial com diferentes origens. O método desenvolvido por Costa (2022) e adaptado no presente trabalho apresentou boa linearidade (coeficiente de determinação, $R^2 \geq 0,90$), limite de detecção de 0,24 % (m/m) e o limite de quantificação de 0,73 % m/m para os EsMAG. A exatidão foi avaliada por meio dos valores de recuperação, que variaram de 96,91% e 103,20%. A precisão foi avaliada determinando o desvio padrão relativo ou o coeficiente de variação (%), que foi encontrado entre 0,092 e 0,377%. A aplicabilidade do método foi parcialmente satisfatória na determinação do teor de EsMAG presentes em amostras de biodiesel comercial, sendo necessária a inclusão de novas amostras de biodiesel comercial e a garantia de uma faixa de tempo menor entre as análises realizadas pela metodologia proposta e a metodologia de referência, para a comparação entre os métodos.

Palavras-chave: biodiesel, ésteres metílicos de ácidos graxos, acilgliceróis, cromatografia de exclusão por tamanho.

ABSTRACT

The reference method employed for analysis of fatty acid methyl esters (FAMES) in biodiesel is based on gas chromatography (GC) technique. GC chromatogram presents a peak for each ester species in biodiesel, requiring an experienced analyst to integrate and quantify the analyte. In comparison to the reference technique, size exclusion chromatography (SEC) has the advantage that the esters in biodiesel will present a single chromatographic peak, simplifying the quantification of the analyte of interest. Thus, the aim of this work was to evaluate the applicability of the method developed by Costa (2022) based on size exclusion chromatography, to determine the content of fatty acid methyl esters present in commercial biodiesel samples, as well as, to present the comparison with the reference method (GC). SEC analysis used 0.5% (v/v) THF in Toluene as mobile phase, a Phenogel column, 5 μm , 100 \AA pore diameter, 300 mm x 7.80 mm (Phenomenex), injection volume was set to 20 μL , a refractive index (RI), presenting an analysis with a total time of 15 minutes. The quantification of the components was done through the construction of analytical curves for methyl oleate was constructed and 5 samples of commercial biodiesel with different matrices were used. The proposed alternative method presented good linearity (coefficient of determination, $R^2 \geq 0,90$), limit of detection of 0,210 % mass and limit of quantification of 0,730 % mass for FAMES. All parameters found are in accordance with the specification for biodiesel in Brazil and in other countries around the world. Accuracy was evaluated by recovery values, ranging from 96,91% to 103,20%. Precision was evaluated by the relative standard deviation (or coefficient of variation), which ranged from 0,092% to 0,377%. The applicability of the method was partially satisfactory in determining the content of EsMAG present in biodiesel, requiring the inclusion of new samples of commercial biodiesel and the guarantee of a shorter period between the analyses carried out by the proposed methodology and the reference methodology.

Keywords: biodiesel, fatty acid methyl esters, acylglycerols, size-exclusion chromatography.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação brasileira de normas técnicas
AG	Acilgliceróis
ANP	Agência nacional de petróleo, gás natural e biocombustíveis
ASTM	<i>American society for testing and materials</i>
B100	Biodiesel puro
BX	Mistura de x% de biodiesel em óleo diesel
CCF	Cromatografia em camada fina
CCFAE	Cromatografia em camada fina de alta eficiência
CET	Cromatografia de exclusão por tamanho
CFG	Cromatografia por filtração em gel
CG	Cromatografia gasosa
CG-CG	Cromatografia gasosa bidimensional
CG/DIC	Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNPE	Conselho nacional de política energética
CPG	Cromatografia de permeação em gel
DAG	Diacilgliceróis
DIC	Detecção de ionização de chama
EFS	Extração em fase sólida
EN	Europäische norm
EsMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
FRNA	Fase reversa não aquosa
GL	Glicerina livre
ICH	<i>International council for harmonisation</i>
IR	Índice de refração
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção

LQ	Limite de quantificação
MAG	Monoacilgliceróis
MP	Material particulado
PMQC	Programa de monitoramento da qualidade dos combustíveis
PNPB	Programa nacional de produção e uso do biodiesel
RMN	Ressonância magnética nuclear
TAG	Triacilgliceróis
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Intervalo de separação de peso molecular para colunas de estireno-divinilbenzeno	34
Tabela 2. Intervalo de separação de peso molecular para coluna Phenogel	35
Tabela 3. Condições operacionais descritas na literatura para a análise de biodiesel por cromatografia de exclusão por tamanho.....	36
Tabela 4. Amostras de produto de transesterificação e de biodieseis comerciais com suas respectivas matrizes	41
Tabela 5. Teor de EsMAG (% mássica) das cinco amostras de biodiesel comercial analisadas por cromatografia de exclusão por tamanho	55
Tabela 6. Parâmetros de validação para a quantificação de EsMAG por cromatografia de exclusão por tamanho do presente trabalho, da curva teste de oleato de metila do primeiro ensaio e da metodologia desenvolvida por Costa (2022), respectivamente	59
Tabela 7. Resultados do teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) (% mássica) das amostras de biodiesel comercial por cromatografia de exclusão por tamanho (CET) e por cromatografia gasosa (CG).....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução do percentual do teor de biodiesel presente no diesel fóssil no Brasil	19
Figura 2. Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil (ANP, 2023).....	21
Figura 3. Reação de transesterificação global (MUNIZ, 2016)	22
Figura 4. Etapas da reação de transesterificação do biodiesel (MUNIZ, 2016)	23
Figura 5. Cromatograma da análise de ésteres metílicos de ácidos graxos, obtido por meio das condições descritas na norma EN 14103 (2011)	28
Figura 6. Cromatograma da análise do produto de transesterificação do óleo de canola com baixa conversão, obtido por CLAE-FRNA, onde: MAG, DAG, TAG e EsMAG são, respectivamente, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis e ésteres metílicos de ácidos graxos (ANDRADE <i>et al.</i> , 2011)	30
Figura 7. Mecanismo de separação por cromatografia de exclusão por tamanho: (a) eluição da mistura de amostra no empacotamento da coluna; (b) caminho que o analito percorre de acordo com seu tamanho molecular; (c) tempo de retenção dos analito da amostra (MOJSIEWICZ-PIEŃKOWSKA, 2013)	32
Figura 8. Estrutura química do polímero de estireno-divinilbenzeno (LEGRAMANTI, 2017)	33
Figura 9. Cromatogramas de uma mistura de padrões de TG (triacilgliceróis), MG (monoacilgliceróis), DG (diacilgliceróis), FAME (ésteres metílicos de ácidos graxos) e FFA (ácidos graxos livres). Fase móvel: A - 0,5 % de diclorometano em tolueno, B –	

0,5 % de acetato de etila em tolueno, C – 0,5 % de acetona em tolueno, D – 0,5 % de ácido acético em tolueno e 0,25 % de ácido acético em tolueno (KITTIRATTANAPIBOON E KRISNANGKURA, 2008) 38

Figura 10. Cromatogramas obtidos por cromatografia por permeação em gel (NAKAGAKI *et al.*, 2008) 39

Figura 11: Cromatogramas obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, do (A.1) produto de transesterificação de baixa conversão e (A.2) produto de transesterificação de alta conversão, onde: MAG, DAG, TAG e EsMAG são, respectivamente, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis e ésteres metílicos de ácidos graxos (COSTA, 2022) 40

Figura 12. Cromatogramas, obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, de produtos de transesterificação de: (a) soja; (b) girassol e; (c) canola, utilizando diluição 5% (v/v) e 100 μ L de injeção, onde: EsMAG são os ésteres metílicos de ácidos graxos 50

Figura 13. Cromatogramas, obtido por cromatografia de exclusão por tamanho, de amostras de biodiesel comercial sendo: (a) T1: 100% óleo de soja; (b) T2: 100% óleo de soja e; (c) T3: 30% óleo de soja, 30% óleo de fritura, 20% sebo bovino e 20% sebo suíno; utilizando diluição 5% (v/v) e 100 μ L de injeção , onde: EsMAG são os ésteres metílicos de ácidos graxos 51

Figura 14. Cromatogramas, obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, de biodiesel comercial A1 (100% óleo de girassol) com: (a) diluição 5% (v/v) e volume de injeção de 10, 20 e 30 μ L; (b) diluição 2,5% (v/v) e volume de injeção de 10, 20 e 30 μ L, onde: EsMAG são os ésteres metílicos de ácidos graxos 52

Figura 15. (a) e (c) Cromatogramas, obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, de curva analítica de linolenato de metila sendo: (a) 20 μL e (c) 30 μL ; (b) e (d) Curvas analíticas de linolenato de metila com concentrações de 1,0%, 4,8%, 9,9%, 40,0%, 89,9% e 99,5% (m/m), sendo: (b) volume de injeção de 20 μL e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9948; (d) volume de injeção de 30 μL e $R^2 = 0,9955$; e EsMAG os ésteres metílicos de ácidos graxos 53

Figura 16. (a) e (c) Cromatogramas, obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, do primeiro teste de curva analítica de oleato de metila sendo: (a) 20 μL e (c) 30 μL ; (b) e (d) Curvas analíticas de oleato de metila do primeiro teste com concentrações de 74,6%, 86,6%, 90,1%, 93,6% e 100% (m/m), sendo: (b) volume de injeção de 20 μL e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9587; (d) volume de injeção de 30 μL e $R^2 = 0,8633$; e EsMAG os ésteres metílicos de ácidos graxos 54

Figura 17: Cromatogramas, obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, do (A1) biodiesel comercial 100% óleo de girassol; (A2) biodiesel comercial proveniente da mistura de óleos (55% óleo de soja, 25% óleo de fritura, 10% sebo bovino e 10% sebo suíno); (A3) e (A4) biodieseis comerciais 100% óleo de soja; e (A5) biodiesel comercial 100% óleo de soja, onde: EsMAG são os ésteres metílicos de ácidos graxos 56

Figura 18. (a) Curva analítica de oleato de metila com concentrações de 79,7%, 85,4%, 88,9%, 94,8% e 100% (m/m), validada no presente trabalho; (b) Cromatogramas, obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, referente à curva analítica de oleato de metila validada no presente trabalho , onde: EsMAG são os ésteres metílicos de ácidos graxos 57

SUMÁRIO

Capítulo 1	Introdução	16
Capítulo 2	Objetivo	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos.....	18
Capítulo 3	Revisão Bibliográfica	19
3.1	O biodiesel.....	19
3.2	O controle de qualidade do biodiesel.....	25
3.2.1	O teor de alquil ésteres no biodiesel.....	27
3.2.2	A cromatografia gasosa (CG) na análise de biodiesel.....	27
3.2.3	A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na análise de biodiesel	29
3.2.3.1	Aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na análise de biodiesel	29
3.2.3.2	Aplicação da cromatografia de exclusão por tamanho (CET) na análise de biodiesel.....	32
Capítulo 4	Material e métodos	41
4.1	Reagentes e solventes.....	41
4.2	Preparo das soluções padrão de EsMAG para construção da curva analítica.....	42
4.3	Análise de EsMAG pelo método de referência (cromatografia gasosa)	42
4.4	Análise de EsMAG por cromatografia de exclusão por tamanho (método adaptado no presente trabalho).....	44
4.4.1	Estudo de diluição das amostras de biodiesel.....	44

4.4.2	Estudo de volume de injeção das amostras de biodiesel.....	44
4.4.3	Análise de ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia de exclusão por tamanho.....	44
4.5	Validação do método de cromatografia de exclusão por tamanho.....	45
4.5.1	Determinação da linearidade	45
4.5.2	Determinação do limite de detecção.....	46
4.5.3	Determinação do limite de quantificação.....	46
4.5.4	Determinação da precisão.....	46
4.5.5	Determinação da exatidão.....	47
4.6	Tratamento estatístico.....	47
4.6.1	Teste de Grubbs.....	47
4.6.2	Teste de Cochran.....	48
Capítulo 5	Resultados e discussão.....	49
5.1	Avaliação dos parâmetros de volume de injeção e diluição da amostra	49
5.1.1	Estudo de diluição das amostras de biodiesel	49
5.1.2	Estudo de volume de injeção das amostras de biodiesel	52
5.2	Análise das amostras de biodiesel comercial por cromatografia de exclusão por tamanho (método proposto)	55
5.3	Validação do método por cromatografia de exclusão por tamanho (método proposto)	57
5.4	Comparação das amostras por cromatografia por exclusão de tamanho (método proposto) e por cromatografia gasosa (método de referência)	61
Capítulo 6	Conclusão.....	63

Capítulo 7	Propostas futuras.....	64
Capítulo 8	Referências Bibliográficas.....	65
Apêndice A	Preparo das soluções padrão para curva analítica de linolenato de metila e oleato de metila.....	70
Apêndice B	Teste de Grubb's das concentrações das curvas analíticas de EsMAG	71
Apêndice C	Teste de Cochran das curvas analíticas de EsMAG	72
Apêndice D	Análise das amostras de biodiesel comercial por cromatografia gasosa (CG).....	73
ANEXO A	Tabela teste de Grubbs.....	76
ANEXO B	Tabela teste de Cochran.....	77

1. INTRODUÇÃO

O biodiesel é um combustível renovável, composto de alquil ésteres de ácidos graxos, produzido, principalmente, a partir da reação de transesterificação de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal, compostos majoritariamente por triacilgliceróis, TAG (ANP, 2014). Em 2004, o governo federal lançou o programa nacional de produção e uso do biodiesel (PNPB) e estabeleceu as condições legais para a inserção do biodiesel na matriz energética do Brasil (ANP, 2019). O biodiesel foi misturado ao diesel fóssil em caráter experimental, e posteriormente, sua obrigatoriedade veio no artigo 2º da [Lei nº 11.097/2005](#), exigindo uma mistura de 2% (v/v) de biodiesel no diesel fóssil (B2) em todo território nacional. O Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), é o órgão responsável pela formulação de políticas e diretrizes de energia no Brasil, e com o amadurecimento do mercado brasileiro, ampliou sucessivamente este percentual a 14% (v/v), em março 2024, como publicado na resolução nº 8/2023. A resolução nº 8 de 19 de dezembro de 2023 determinou um cronograma que estabelece o aumento do teor de biodiesel em 2025 para 15% (v/v) (B15). O Projeto de Lei 4516/23, batizado como Combustível do Futuro, tem o objetivo de promover a mobilidade sustentável de baixo carbono e ajudar o Brasil atingir metas internacionais de redução das emissões de gases de efeito estufa. Dentre o conjunto de medidas, propõe-se a elevação do teor de mistura de biodiesel no diesel fóssil para 20% (v/v) até 2030, e 25% (v/v) após 2031.

Diante do aumento sucessivo do teor de biodiesel no óleo diesel e, também, da perspectiva de crescimento de demanda, faz-se necessário o monitoramento da qualidade deste biocombustível produzido, distribuído e comercializado nos postos de abastecimento em todo território nacional. As especificações do biodiesel puro (B100) são estabelecidas pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), pela resolução nº 920 de 04 de abril de 2023, tornando os critérios de avaliação da qualidade do biodiesel brasileiro mais restritivos. Os padrões de qualidade presentes nesta resolução tomaram como referência as normas ASTM D6751 e EN 14214. Os 24 parâmetros descritos nas especificações do biodiesel se referem às suas características químicas e físico-químicas, que afetam diretamente a qualidade do combustível, tais como o teor de éster mínimo, teores

máximos de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG), triacilgliceróis (TAG), viscosidade cinemática e ponto de fulgor.

Segundo a norma ASTM D6584, a cromatografia gasosa (CG) é a técnica de referência para a análise de ésteres em biodiesel. Entretanto, esta técnica é relativamente complexa, pois, por se tratar de uma técnica bastante sensível, seu cromatograma apresenta um pico para cada espécie de éster presente no biodiesel, necessitando de um analista experiente para integrar e quantificar o analito de interesse. Neste contexto, a técnica de cromatografia de exclusão por tamanho (CET) é uma técnica que separa moléculas de tamanhos diferentes pelo seu volume hidrodinâmico, pelo fracionamento em colunas de gel, composta de polímeros sintéticos porosos (ultra-hidrogéis). Estas colunas permitem que moléculas maiores eluam mais rapidamente que moléculas pequenas, que ficam temporariamente retidas no interior das cavidades do ultra-hidrogel. Comparada à técnica de referência, esta técnica apresenta a vantagem de que os ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) presentes no biodiesel serão representados por um único pico cromatográfico, simplificando significativamente o cromatograma para integração e quantificação do analito de interesse. A especificação requer apenas a determinação do teor total de ésteres, eliminando a necessidade de identificar a proporção de cada tipo de éster na amostra, como na técnica de cromatografia gasosa. Integrar um único pico que representa o teor total de ésteres é significativamente mais simples e otimiza a análise. Outra vantagem desta metodologia é o tempo de análise que dura 15 minutos, em comparação com a técnica de referência, dura 30 minutos (KOAKUZU *et al.*, 2015).

Este trabalho utilizou a metodologia desenvolvida por (COSTA, 2022), em que foram utilizadas amostras padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) e acilgliceróis para a identificação e quantificação, simultaneamente, do teor de MAG, DAG, TAG e EsMAG. O principal objetivo desse estudo é avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido por (COSTA, 2022), baseado na cromatografia de exclusão por tamanho, para a determinação do teor de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes em amostras de biodieseis comerciais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido por Costa (2022), baseado na cromatografia de exclusão por tamanho, para a determinação do teor de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes em amostras de biodieseis comerciais.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar o teor de EsMAG em amostras de biodieseis comerciais utilizando o método desenvolvido por Costa (2022), após adaptações, e o método de referência;
2. Determinar a linearidade, o limite de detecção, o limite de quantificação, a exatidão e a precisão do método desenvolvido por Costa (2022) e adaptado no presente trabalho;
3. Comparar os resultados obtidos pelos métodos desenvolvido por Costa (2022), após adaptações, e o método de referência.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O biodiesel

O biodiesel é um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da reação de transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal. Uma definição mais ampla descreve o biodiesel como um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (EMBRAPA, 2021; ANP, 2020).

O biodiesel é um combustível renovável que apresenta características semelhantes às do óleo diesel, podendo ser utilizado em misturas com o combustível de origem fóssil, em diferentes proporções. As misturas recebem o nome de acordo com os percentuais do biodiesel adicionados à mistura. Para a mistura de x% em volume, a denominação é Bx (x% de biodiesel no óleo diesel), por exemplo, a mistura de 7% chama-se B7 (7% de biodiesel e 93% de óleo diesel) (COSTA, 2015). A **Figura 1** abaixo apresenta a evolução do percentual de biodiesel no diesel fóssil na matriz energética brasileira.

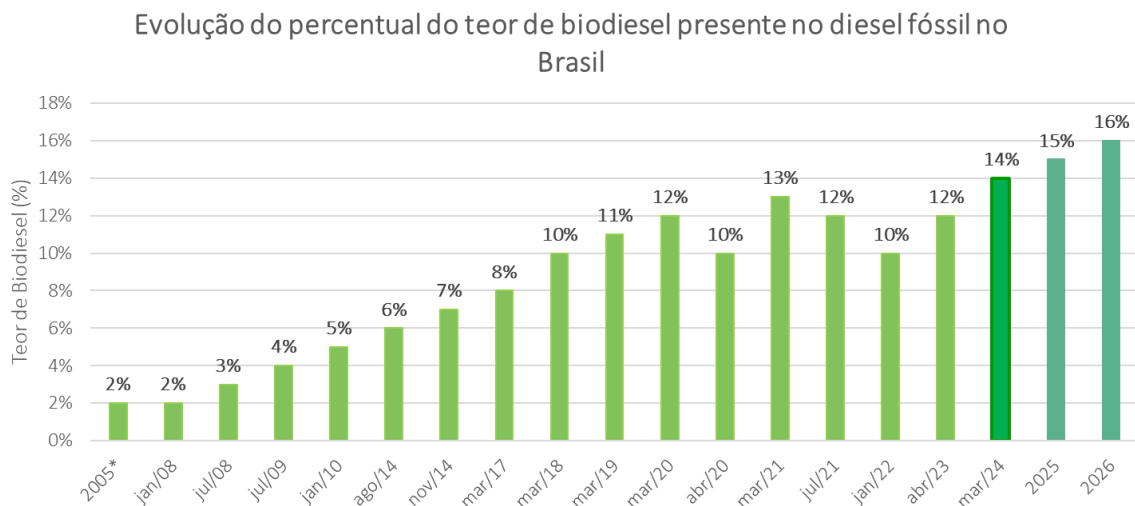


Figura 1. Evolução do percentual do teor de biodiesel presente no diesel fóssil no Brasil.

O biodiesel é um combustível renovável que pode ser usado em um motor de ignição à compressão (diesel), sem necessidade de modificação. O biodiesel pode reduzir significativamente as emissões de gás carbônico e óxido de enxofre, principais responsáveis pelo efeito estufa e chuva ácida. Além disso, é simples de ser usado, biodegradável, não tóxico e essencialmente livre de compostos sulfurados e aromáticos. O diferencial do Brasil em relação a outros países está na sua biodiversidade, pois permite a geração de energia por diversos métodos, principalmente a biomassa, para produção de combustíveis renováveis, como o álcool, o biodiesel, e, mais recentemente, o H-bio. O H-Bio é um processo desenvolvido pela Petrobras que envolve a produção de biocombustíveis a partir da hidrogenação de óleos vegetais e gorduras animais. Este método permite a produção de diesel renovável, misturando óleos vegetais com petróleo, utilizando a infraestrutura existente das refinarias de petróleo. O resultado é um biocombustível que pode ser utilizado em motores a diesel convencionais, reduzindo a emissão de gases de efeito estufa e promovendo uma alternativa mais sustentável aos combustíveis fósseis tradicionais. (PACHECO, 2006; SANTOS, 2012).

Quando o biodiesel é comparado ao óleo diesel em testes do motor, a energia e o consumo de combustível estão em proporção quase direta ao conteúdo energético do combustível. O biodiesel é um combustível oxigenado, de 10% a 11% de oxigênio em peso e produz menos hidrocarbonetos não queimados, monóxido de carbono e partículas do que o diesel. O dióxido de carbono é reciclado através do processo de fotossíntese no cultivo de oleaginosas, tornando o biodiesel quase neutro em CO₂. (GERPEN *et al*, 2007).

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), com o objetivo de estabelecer um padrão de qualidade, vem aprimorando constantemente a especificação do biodiesel ao longo dos anos, o que tem contribuído para a sua harmonização com as normas internacionais e alinhamento da sua qualidade às condições do mercado brasileiro, assegurando maior segurança e previsibilidade aos agentes econômicos (ANP, 2021).

Atualmente, o Brasil se encontra como o segundo maior produtor de soja do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos, e ele apresenta um programa de produção de biodiesel que estabelece medidas que apontam para a sustentabilidade através do desenvolvimento regional com ênfase na agricultura familiar e com a criação do selo social,

objetivando também a uma política de inclusão social e distribuição de renda. O complexo de soja brasileiro é responsável por gerar um número significativo de empregos e sua exportação se tornou extremamente importante para a economia do país (FOSCHIERA, 2008; APROSOJA, 2019).

O Brasil, por ser detentor de uma grande extensão territorial, apresenta uma ampla diversidade de matérias-primas para a produção de biodiesel, como a soja, o girassol, a mamona, o milho, o pinhão manso, o caroço de algodão, a canola, o babaçu, o buriti, o dendê, a macaúba e o amendoim, além das de origem animal como o sebo bovino e as gorduras de frango e de suínos. Os óleos de descarte, óleos de vísceras de peixes e óleos usados para cocção de alimentos (óleo de fritura) também são utilizados como matérias-primas alternativas. No entanto, é importante ressaltar que as propriedades químicas e físicas da matéria-prima estão diretamente associadas à tecnologia e ao rendimento do processo de conversão e, por conseguinte, às variações na qualidade final do produto para fins combustíveis (RAMOS *et al.*, 2017).

A **Figura 2** apresenta o gráfico com a porcentagem de cada matéria-prima empregada na produção de biodiesel no Brasil.

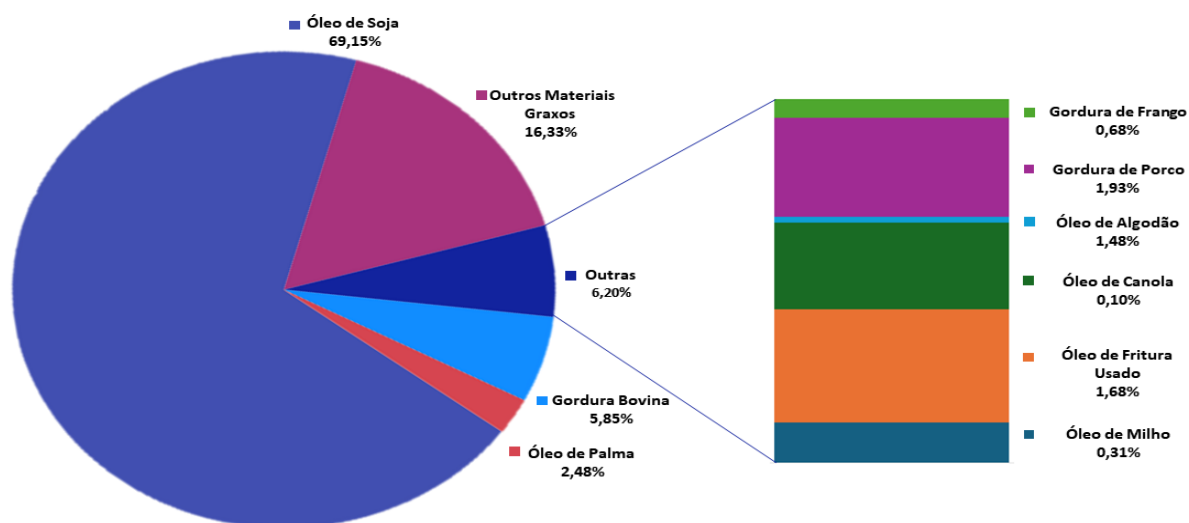


Figura 2. Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil (ANP, 2023).

O biodiesel pode ser produzido por meio da transesterificação de triacilgliceróis ou pela esterificação de ácidos graxos. O processo mais utilizado é a reação de transesterificação de triacilgliceróis, também conhecido por alcoólise, por catálise básica homogênea e utilizando metanol ou etanol na reação, obtendo como produtos ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e glicerol (SILVA, 2016).

A reação de transesterificação (**Figura 3**), é o processo de transformação de um éster em outro, por meio da troca do grupo alcoxi presente no éster original, por outro grupo semelhante proveniente de um álcool, na presença de um catalisador, para dar origem à glicerina e o mono-álquil ésteres (biodiesel) (DABDOUB *et al.*, 2009).

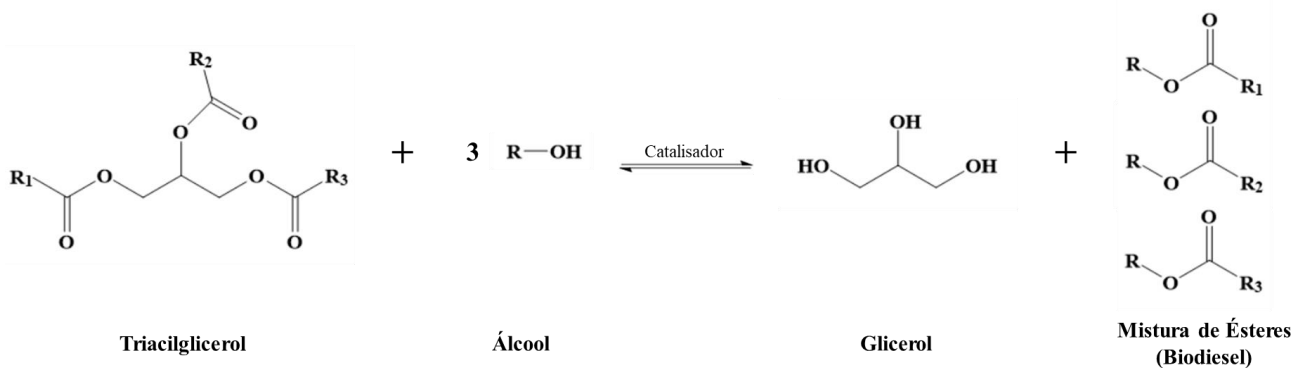


Figura 3. Reação de transesterificação global (MUNIZ, 2016).

Na **Figura 3**, os grupos R₁, R₂ e R₃ representam as cadeias hidrocarbônicas do ácido graxo saturado ou insaturado; podendo ser iguais ou diferentes. O grupo R representa a cadeia alquílica do álcool.

A razão molar estequiométrica de álcool de óleo na transesterificação é de 3:1 (três mols de álcool para um mol de óleo), porém, a reversibilidade das reações envolvidas faz com que seja necessário o emprego de um excesso de álcool no meio de reação para deslocar o equilíbrio no sentido da produção dos ésteres e assim promover um aumento no rendimento em ésteres (MENEGETTI *et al.*, 2013).

A reação de transesterificação com álcool se dá em três etapas consecutivas, conforme pode ser observado na **Figura 4**. A primeira etapa é a conversão dos triacilgliceróis em diacilgliceróis, a segunda etapa é a conversão destes em monoacilgliceróis e, finalmente,

a conversão em glicerol, resultando em uma molécula de éster alquílico de ácido graxo em cada etapa (BORGES, DIAZ, 2012).

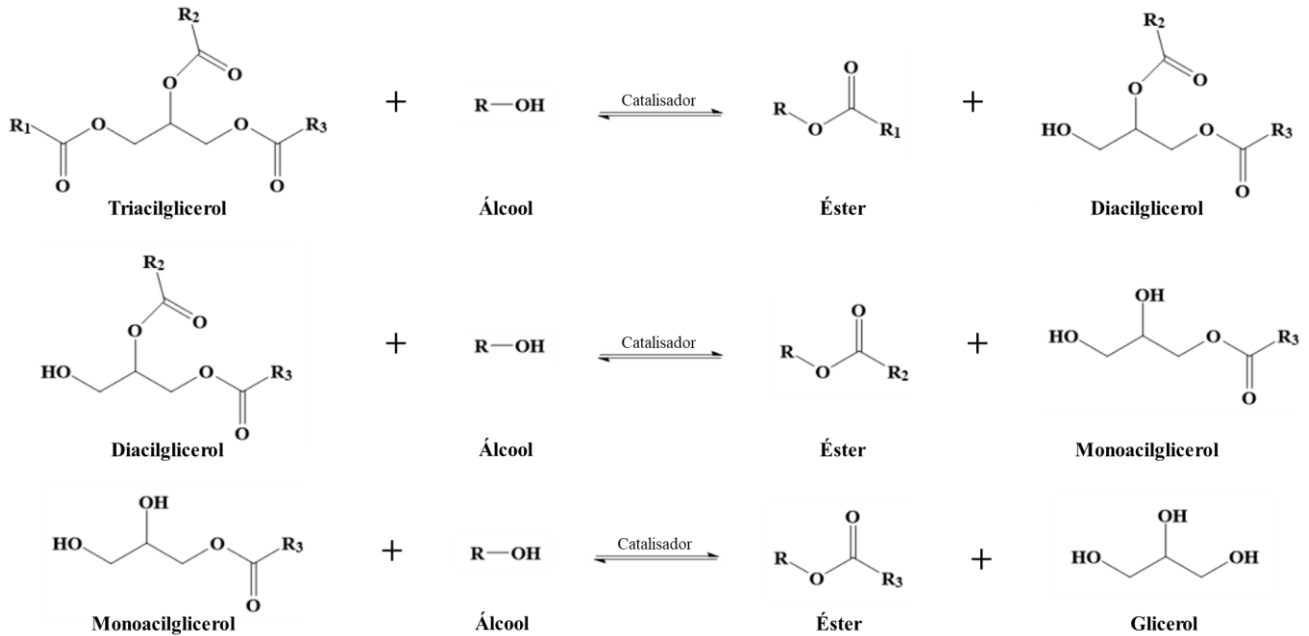


Figura 4. Etapas da reação de transesterificação do biodiesel (MUNIZ, 2016).

Na **Figura 4**, os grupos R₁, R₂ e R₃ representam as cadeias hidrocarbônicas do ácido graxo saturado ou insaturado; podendo ser iguais ou diferentes. O grupo R representa a cadeia alquílica do álcool.

Alguns aspectos como o tipo de catalisador, razão molar de álcool e óleo vegetal, a temperatura, a pureza dos reagentes e o conteúdo de ácido graxo livre influenciam diretamente no rendimento da reação de transesterificação.

A reação de transesterificação é realizada na presença de catalisadores ácidos, básicos ou enzimáticos. Os catalisadores mais utilizados são os catalisadores homogêneos alcalinos, que são mais eficientes, promovendo altos rendimentos. Dentre estes, os alcóxidos são mais ativos, resultando em rendimentos superiores a 98% na reação, no entanto, são mais sensíveis à presença de água. Os hidróxidos de potássio e de sódio, apesar de menos reativos, apresentam menor custo, promovem rendimentos satisfatórios e têm sido amplamente empregados (COSTA, 2015; SCHUCHARDT, 1998).

Os álcoois que podem ser usados no processo de transesterificação incluem metanol e etanol. Dentre esses, são preferidos os de baixa massa molar, sendo o metanol e o etanol, os usados com mais frequência devido à maior facilidade de dissolução do catalisador básico, menor custo, decantação mais rápida de glicerina e maior polaridade. O metanol é mais utilizado, e vantajoso, pois o rendimento é muito alto e apresenta baixo custo. Em contrapartida, o metanol apresenta elevada toxicidade (GARCIA, 2006; LIMA, 2007; RINALDI, 2007; LEUNG *et al.*, 2010) e é de origem fóssil.

A maioria dos catalisadores (por exemplo, NaOH, KOH) são em forma sólida e não se dissolvem, prontamente, em metanol. Desta forma, é necessário agitar o metanol e adicionar, lentamente, e, cuidadosamente, o catalisador (ISTC, 2006). Uma vez que o catalisador se dissolva completamente no metanol, o metóxido está pronto para ser adicionado ao óleo. Quando o metóxido e o óleo são misturados e agitados num recipiente de reação, a reação de transesterificação é iniciada (LEUNG *et al.*, 2010).

O efeito das condições de reação, sobre o rendimento do produto, aponta que o pré-aquecimento do óleo antes da adição da mistura, pode aumentar a velocidade da reação e, conseqüentemente, diminuir o tempo de reação. Temperaturas elevadas diminuem a viscosidade, melhorando assim a transferência de massa entre os componentes. No entanto, altas temperaturas devem ser evitadas, pois podem acelerar a saponificação. Além disso, a temperatura da reação não deve exceder o ponto de ebulição dos reagentes (LEUNG *et al.*, 2010; LEUNG e GUO, 2006). A temperatura padrão para que ocorra a reação, pela catálise alcalina é 60°C, mas dependendo do tipo de catalisador empregado, diferentes temperaturas darão diferentes graus de conversão, e por essa razão a faixa de temperatura deve estar entre 25°C e 120°C. Para a catálise ácida a faixa de temperatura varia de 55°C a 80°C (SILVA, 2016).

Uma vez que a reação de transesterificação é completada, dois produtos principais são formados: ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol. A fase de glicerol é mais densa do que a fase de biodiesel e se deposita no fundo do recipiente de reação, permitindo que ele seja separado da fase de biodiesel. A separação de fases pode ser observada após alguns minutos ou no máximo em algumas horas em repouso. Tanto o biodiesel quanto o glicerol são contaminados com o catalisador, o álcool e o óleo que não

reagiu, durante a reação de transesterificação. Portanto, o biodiesel bruto precisa ser purificado antes da sua utilização (COSTA, 2015).

Os processos de purificação do biodiesel são necessários pois o biodiesel produzido contém impurezas, como glicerol livre, sabão, ácidos graxos livres, álcool, catalisadores, metais e glicerídeos. O excesso do álcool que não reagiu na produção do biodiesel e o catalisador residual podem danificar os componentes do motor; e o sabão no biodiesel pode reduzir a lubrificação do combustível e causar superaquecimento, aceleração excessiva e dificuldades no injetor do motor e criar depósitos (NABI *et al.*, 2018; SITOIE, 2019).

O biodiesel é um combustível alternativo para motores a diesel. A combustão do biodiesel resulta em menos poluição do ar em comparação com o diesel de petróleo devido ao seu maior teor de oxigênio e falta de enxofre e compostos aromáticos. Mais especificamente, a combustão do biodiesel resulta em menos emissões de material particulado (MP), monóxido de carbono (CO) e hidrocarbonetos não queimados. Nesse sentido, o biodiesel também pode ser uma alternativa promissora para ônibus urbanos, que são a principal fonte de altos níveis de emissões de MP e CO em áreas urbanas (TAMILSELVAN *et al.*, 2017; RAJAEIFAR *et al.*, 2019).

3.2. O controle de qualidade do biodiesel

Para a comercialização de um combustível, é de vital importância que a sua qualidade seja garantida a fim de proporcionar características físico-químicas uniformes em todos os pontos de abastecimento em qualquer parte do país. A qualidade do combustível irá influir, decisivamente, em aspectos relevantes, do ponto de vista do distribuidor, do comerciante, do frentista operador da bomba, do consumidor final e da própria sociedade, além de poder justificar a mistura de biodiesel ao diesel a um preço igual ou menor que o diesel. Se a qualidade do biodiesel não atingir os limites técnicos necessários podem obstruir o filtro, perder a fluidez no frio e causar danos ao motor por alto conteúdo de água, (QUADROS *et al.*, 2011; GUTIÉRREZ-OPPE, 2013).

Alguns fatores podem interferir na qualidade do biodiesel, como as estruturas moleculares dos seus ésteres ou a presença de contaminantes provenientes da matéria-

prima, do processo de produção ou estocagem do biodiesel. As estruturas moleculares dos ésteres podem variar tanto no tamanho da cadeia carbônica, quanto na quantidade e posição de insaturações. Durante o processo de produção do biodiesel, podem estar presentes em maior ou menor quantidade: glicerina livre, triacilgliceróis não reagidos, sabões, álcool residual, resíduos de catalisadores e água. Devido a isto, é necessário estabelecer os limites dos contaminantes, para que não afetem a qualidade das emissões da queima, a integridade e desempenho do motor e a segurança no transporte e manuseio. Devem ser monitoradas, também, possíveis degradações do produto durante o processo de estocagem. (LOBO *et al.*, 2009).

A ANP como órgão responsável para a normalização e fiscalização dos combustíveis tem responsabilidades, tais como: implementar a política nacional de petróleo e gás natural; proteger os interesses dos consumidores quanto a preço, qualidade e oferta de produtos; regular e autorizar as atividades relacionadas à produção, importação, exportação, armazenagem, estocagem, distribuição, revenda e comercialização do biodiesel; especificar a qualidade dos derivados de petróleo, gás natural e seus derivados e dos biocombustíveis (GUTIÉRREZ-OPPE, 2013).

Em relação à qualidade, a ANP especifica os limites de diversos parâmetros por meio da edição de resoluções específicas para cada combustível, incluindo o biodiesel. Para verificar o cumprimento dessas especificações, a ANP criou o Programa de Monitoramento da Qualidade dos Combustíveis (PMQC). Os principais objetivos do programa são o levantamento dos indicadores gerais da qualidade dos combustíveis do país e a identificação de focos de não conformidade, visando a simetria de informações, orientação e aperfeiçoamento da atuação da área de fiscalização da Agência. Para isso, são coletadas amostras de gasolina, etanol e óleo diesel, em pontos de revenda de combustível em todo o território nacional, e o material é analisado em laboratórios de universidades e instituições de pesquisa cadastrados no programa. (ANP, 2020).

Os parâmetros de qualidade do biodiesel estabelecido de acordo com a Resolução ANP Nº 920 de 2023 podem ser divididos em dois grupos: (i) ensaios físico-químicos, tais como viscosidade, ponto de fulgor, e massa específica, que caracterizam as propriedades físico-químicas do combustível; e (ii) análises químicas, tais como teores de ésteres, de

metanol ou etanol, de glicerina e de íons metálicos, que avaliam a pureza do combustível (MIRANDA E MOURA, 2016).

3.2.1. Teor de alquil ésteres no biodiesel

O teor de ésteres metílicos de ácidos graxos é um parâmetro importante previsto na Resolução ANP Nº 920, 2023 que especifica a percentagem mínima exigida de éster, relacionando diretamente a eficiência do processo de conversão de matéria-prima em biodiesel e destaca-se por refletir a pureza do biodiesel a ser misturado ao óleo diesel (LOBO *et al.*, 2009; MIRANDA E MOURA, 2016).

O teor mínimo de éster exigido pela Resolução brasileira atual é de 96,5% (em massa), sendo determinado por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG/DIC) com padronização interna, conforme descrito no método EN 14103.

A alta pureza do biodiesel promove uma combustão mais limpa e eficiente; melhor rendimento do motor; gases de exaustão mais limpos e maior tempo de vida útil do motor. Um cuidado que deve ser tomado em virtude das características dos ésteres, é em relação às mangueiras, borrachas, elastômeros, pinturas e demais polímeros, pois o biodiesel pode dissolvê-los. Esse problema é proporcionalmente reduzido quando se utiliza misturas de biodiesel com diesel fóssil. A indústria automobilística já dispõe de materiais e tecnologia adequados para substituir as peças que podem ser atacadas pelo biodiesel (GASPARINI, 2010).

3.2.2. A cromatografia gasosa (CG) na análise de biodiesel

Para se determinar experimentalmente o teor de éster segundo a Resolução ANP Nº 45, 2014, deve-se utilizar a CG, empregando um detector por ionização de chama (DIC, no inglês FID - *Flame Ionization Detector*). Esta Resolução recomenda o método europeu (EN 14103) e brasileiro (ABNT NBR 15764) para tal determinação. As especificações desta análise, segundo o método EN 14103, são as seguintes: injetor Split/Splitless (250 °C), coluna capilar (30 m x 0,25 mm), com um filme de polietileno glicol (0,25 µm), como fase

estacionária e com um DIC à 250 °C. Além disso, o forno deve ser mantido a 60 °C por 2 min, e depois, aquecido a 10 °C/min até 200 °C, quando a velocidade de aquecimento deve ser reduzida para 5 °C/min até atingir 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 7 min. Por meio da comparação da área total dos picos correspondentes com a área do pico do nonadecanoato de metila (padrão interno), se obtém a massa do éster. O método quantifica ésteres metílicos de ácidos graxos com cadeias de 6 a 24 carbonos, saturados ou insaturados.

A **Figura 5** mostra o perfil cromatográfico da análise de EsMAG, obtido por meio das condições descritas na norma EN 14103 (2011).

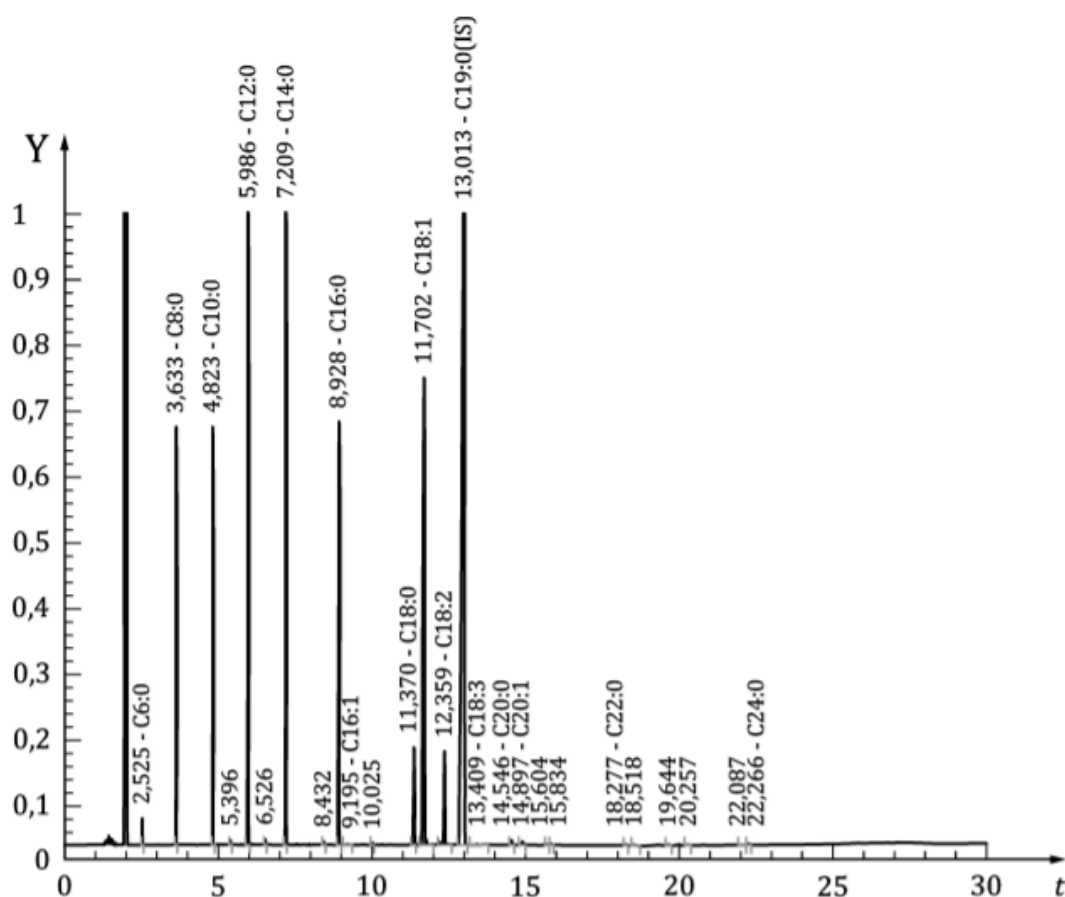


Figura 5. Cromatograma da análise de ésteres metílicos de ácidos graxos, obtido por meio das condições descritas na norma EN 14103 (2011).

A **Figura 5** apresenta o perfil cromatográfico obtido na análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos, segundo a norma EN 14103 (2011). Esses resultados apresentam a diversidade de EsMAG que podem conter amostras provenientes de fontes vegetais.

No Brasil a utilização dessa norma apresenta algumas limitações, como a diversidade de matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel e a análise de biodieseis obtidos utilizando etanol como reagente. É importante que exista uma metodologia alternativa à EN 14103 que aborde a ampla variedade de matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel no Brasil, visto que este produto quando comercializado tende a ser uma mistura de diferentes matrizes (GASPARINE, 2010).

3.2.3. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na análise de biodiesel

3.2.3.1. Aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na análise de biodiesel

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é apontada como uma alternativa para análise de biodiesel por apresentar vantagens como: menor tempo de análise e a quantificação de alquilésteres, ácidos graxos livres e glicerídeos, o que permite seu emprego no monitoramento da reação de transesterificação. Por outro lado, o número grande de informações obtidas através da CLAE pode ser interpretado como desvantagem, tendo em vista o grande número de compostos existentes no biodiesel (LOBO *et al.*, 2009).

Andrade *et al.* (2011) realizaram a separação dos acilgliceróis do biodiesel B100 por extração em fase sólida (EFS) e caracterizaram os principais componentes do biodiesel por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa não aquosa (CLAE-FRNA), utilizando como fase móvel metanol e 2- propanol:n-hexano (5:4, v/v) e detector UV a 205 nm. Um novo método de extração em fase sólida (EFS), utilizando cartuchos aminopropilsilano foi proposto para enriquecer e separar os acilgliceróis (mono-, di- e triacilgliceróis) de biodiesel B100. O método da CLAE-FRNA foi capaz de separar os ésteres metílicos de ácidos graxos e as diferentes classes de acilgliceróis, tornando-se uma alternativa para monitorar a conversão de diferentes óleos vegetais. O conjunto das técnicas

de CLAE-FRNA e EFS pode ser um novo ponto de partida para o desenvolvimento de métodos alternativos de monitoramento da qualidade de biodiesel, para o isolamento dos acilgliceróis e para a produção de materiais de referência. A **Figura 6** apresenta o cromatograma da análise do produto de transesterificação do óleo de canola com baixa conversão por CLAE-FRNA obtidos no trabalho (ANDRADE *et al.*, 2011).

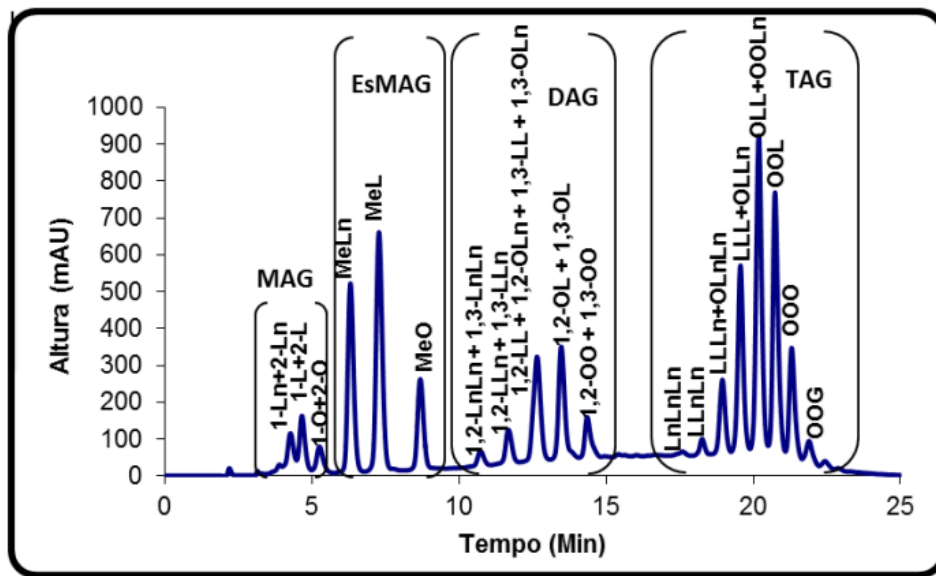


Figura 6. Cromatograma da análise do produto de transesterificação do óleo de canola com baixa conversão, obtido por CLAE-FRNA, onde: MAG, DAG, TAG e EsMAG são, respectivamente, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis e ésteres metílicos de ácidos graxos (ANDRADE *et al.*, 2011).

Rodrigues *et al.* (2016) desenvolveram uma metodologia simples e rápida para o monitoramento e a quantificação simultânea dos principais componentes do biodiesel por CLAE. Utilizaram um cromatógrafo com detector evaporativo de espalhamento de luz - DEEL (*Evaporative Light Scattering Detector*, ELSD) e coluna de fase reversa. Os ácidos graxos, ésteres metílicos e glicerídeos foram separados com o auxílio de fase móvel constituída por metanol, água, isopropanol e hexano, apresentando boa separação e resolução dos picos. As curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação superior a 0,99. Aplicou-se o método em amostras do óleo e do biodiesel obtidos da polpa da macaúba. Portanto, a

presente abordagem pode fornecer informações úteis para estimar com precisão a composição do biodiesel com o emprego do CLAE-DEEL (RODRIGUES *et al.*, 2016).

Santos *et al.* (2016) utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de índice de refração (CLAE-IR) para quantificar simultaneamente os teores MAG, DAG, TAG e EsMAG do biodiesel. O método proposto apresentou resultados satisfatórios quando comparado com os obtidos pelo método de referência (CG), principalmente quando esses resultados estavam dentro das faixas de trabalho do método de referência. O método proposto usando CLAE-IR é, portanto, promissor e pode potencialmente ser usado no lugar do método de referência, pois os resultados obtidos foram estatisticamente equivalentes, com 95% de confiança, aos resultados obtidos pelo método de referência (CG) para as nove amostras de biodiesel comercial analisadas neste estudo (SANTOS *et al.*, 2016).

Syed (2017) utilizou a CLAE para a determinação de compostos formados durante a produção de biodiesel a partir de óleo de karanja e jatropha. O metanol foi utilizado para o monitoramento rápido da conversão de triacilgliceróis em ésteres metílicos de ácidos graxos e para quantificação de triacilgliceróis residuais, no produto final de biodiesel. Na análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos em misturas de biodiesel foi utilizado um índice de refração e um detector UV a 238 nm. Os triacilgliceróis individuais, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ésteres metílicos dos ácidos oleico, linoleico e linolênico e ácidos graxos livres foram separados em uma análise cromatográfica de 40 min (SYED, 2017).

Souza *et al.* (2018) utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE-UV) para determinar o teor de éster metílico de ácidos graxos do biodiesel. Padrões externos foram utilizados para a quantificação de ésteres metílicos de ácidos graxos por CLAE-UV. As curvas analíticas dos padrões de oleato de metila, linoleato de metila e linolenato de metila apresentaram boa linearidade (coeficiente de determinação $\geq 0,995$). O teste de Cochran foi usado para avaliar a homocedasticidade das curvas analíticas. Os limites de detecção e quantificação foram encontrados: 0,0018% em massa e 0,0054% em massa para o oleato de metila, 0,0002% em massa e 0,0007% em massa para o linoleato de metila e 0,0001% em massa e 0,0004% em massa para o metil linolenato. A exatidão do método CLAE-UV foi avaliada pela determinação da recuperação (%), que resultou em valores entre $81,7 \pm 0,2$ e $110,9 \pm 0,1$. A precisão foi avaliada determinando o desvio padrão relativo (%), que foi encontrado entre 0,2 e 1,3. O método proposto por CLAE-

UV mostrou-se eficiente na determinação do teor de éster metílico de ácidos graxos do biodiesel e o teste t pareado mostrou que os resultados são estatisticamente semelhantes (95% de confiança) em comparação ao método de referência (CG) (SOUZA *et al.*, 2018).

3.2.3.2. Aplicação da cromatografia de exclusão por tamanho (CET) na análise de biodiesel

A cromatografia de exclusão por tamanho é uma técnica que classifica as moléculas de acordo com seu tamanho em solução. As partículas da fase estacionária são porosas, com tamanho de poro controlado. As macromoléculas menores são capazes de penetrar nesses poros à medida que passam pela coluna, mas as maiores são grandes demais para serem acomodadas e permanecem no espaço intersticial. As moléculas menores são apenas temporariamente retidas e fluem pela coluna até encontrarem outros poros de partículas para entrar. As moléculas maiores fluem mais rapidamente ao longo do comprimento da coluna porque não podem residir dentro dos poros, conforme visto na **Figura 7** (WU, 2003; MOJSIEWICZ-PIEŃKOWSKA, 2013).

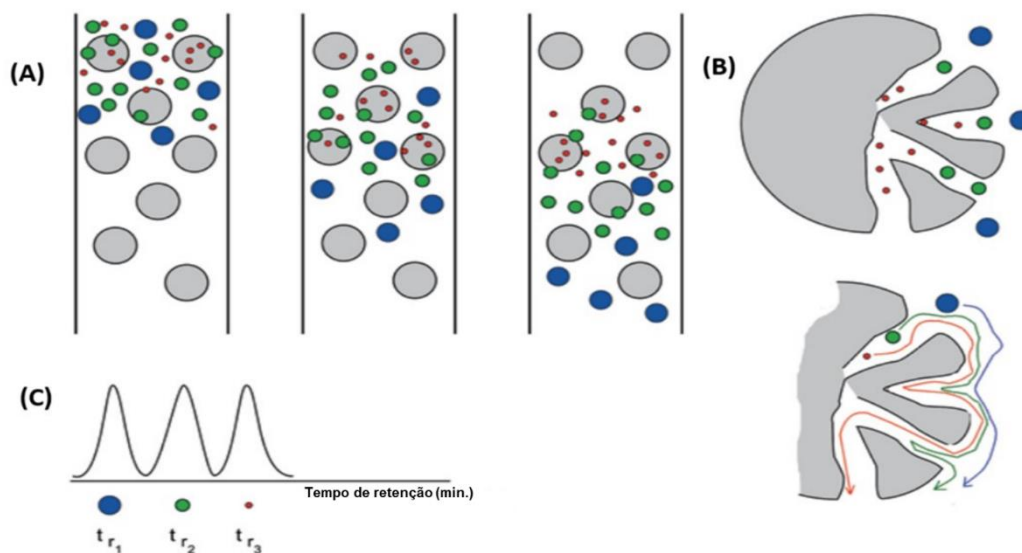


Figura 7. Mecanismo de separação por cromatografia de exclusão por tamanho: **(a)** eluição da mistura de amostra no empacotamento da coluna; **(b)** caminho que o analito percorre de acordo com seu tamanho molecular; **(c)** tempo de retenção dos analitos da amostra (MOJSIEWICZ-PIEŃKOWSKA, 2013).

Os tamanhos moleculares são separados em bandas cromatográficas distintas (**Figura 7**). Um detector situado na extremidade da coluna gera um sinal (pico) para cada banda, cujo tamanho é proporcional à concentração. Um cromatograma obtido por cromatografia de permeação em gel (CPG) mostra componentes com o mesmo peso molecular em um único pico (WU, 2003).

A análise de ésteres de ácidos graxos do biodiesel por cromatografia de exclusão por tamanho (CET) segue este princípio, pela diferença de seus respectivos volumes hidrodinâmicos, pelo fracionamento em colunas de gel, composta de polímeros sintéticos porosos (ultra-hidrogéis). Estas colunas permitem que moléculas maiores eluam mais rapidamente que moléculas pequenas, que ficam temporariamente retidas no interior das cavidades do ultra-hidrogel (KOAKUZU *et al.*, 2015).

A CET engloba duas classes: filtração em gel (CFG) e permeação em gel (CPG). A CFG, empregando fase móvel aquosa, tem aplicação na separação de biomacromoléculas. A CPG, com fase móvel orgânica, tem sido particularmente aplicada na caracterização de massas moleculares de polímeros sintéticos. Os suportes típicos funcionalizados para as fases estacionárias são: (a) CFG: sílica (10 ou 5 μm); (b) CPG: polímeros de estireno-divinilbenzeno (**Figura 8**), que apresentam distribuição de poros de 6 té 400 nm, permitindo a separação de polímeros de $5\text{-}10 \times 10^6$ Da (AQUINO NETO & SOUZA NUNES, 2003).

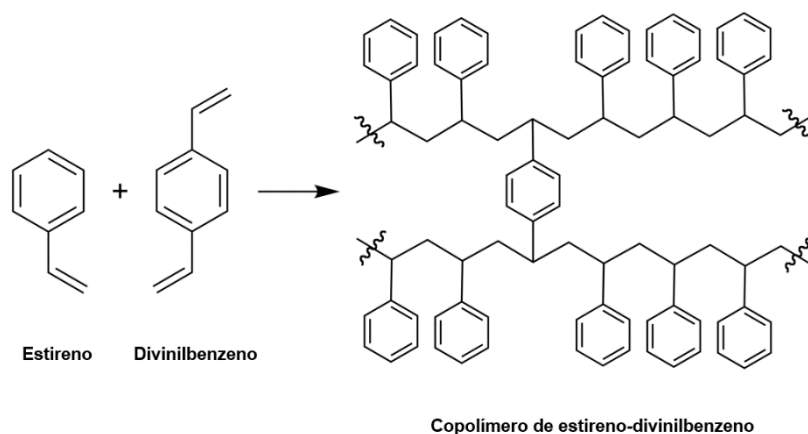


Figura 8: Estrutura química do polímero de estireno-divinilbenzeno.

A **Tabela 1** apresentano intervalo de separação de peso molecular para colunas de tamanhos de poros individuais de preenchimentos de estireno-divinilbenzeno, com base nos limites de exclusão de comprimento de cadeia de poliestireno, em Angstroms (WATERS, 2014).

Tabela 1. Intervalo de separação de peso molecular para colunas de estireno-divinilbenzeno.

Intervalo de peso molecular	Tamanho de poro
100 – 1 K	50 Å
250 – 2,5 K	100 Å
1 K – 18 K	500 Å
5 K – 40 K	10 ³ Å
10 K – 200 K	10 ⁴ Å
50 K – 1,000 K	10 ⁵ Å
200 K – >5,000 K	10 ⁶ Å
500 K – Aprox. 20,000 K	10 ⁷ Å
Aprox. 1 K a 10,000 K	Leito misto – alto
Aprox. 100 – 100 K	Leito misto – baixo

K – Mil unidades; Å – Angstroms.

A **Tabela 2** faz a mesma relação para colunas Phenogel, classificando para diferentes tipos de amostras (ALLCROM, 2024).

Tabela 2. Intervalo de separação de peso molecular para coluna Phenogel.

Tipo de amostra	Intervalo de peso molecular	Coluna Phenogel
	100 – 3 K	50 Å
Orgânicos pequenos	500 – 6 K	100 Å
	1 K – 15 K	500 Å
	1 K – 75 K	10 ³ Å
Resinas	5 K – 500 K	10 ⁴ Å
	10 K – 1,000 K	10 ⁵ Å
	60 K – 10,000 K	10 ⁶ Å
Polímeros de alto peso molecular	100 – 10,000 K	Linear (2)

K – Mil unidades; Å – Angstroms.

A **Tabela 3** apresenta as condições operacionais descritas na literatura para a análise de biodiesel por CPG.

Tabela 3. Condições operacionais descritas na literatura para a análise de biodiesel por cromatografia de exclusão por tamanho.

Fase Estacionária	L (mm)	d.i (mm)	d.p (µm)	Vazão (mL/min)	Fase móvel	Modo de eluição	Temperatura Coluna(°C)	Detector	Classes Separadas	Referência
PLGel – GPC	300	7,5	-	-	THF	Isocrática	40	DIR	MAG, DAG, TAG, GL	SCHOENFELDER, 2003
Styragel	300	7,8	-	1,0	Tolueno	Isocrática	-	UV (254nm)	EsMOG, EsEOG	MADRAS, <i>et al.</i> ;2004
Styragel HR 0,5 e HR 0,2	300	7,8	5	1,0	THF	Isocrática	-	DIR	MAG, DAG, TAG, EsMOG e GL	ARZAMENDI, <i>et al.</i> ;2004
Phenogel	300	7,8	5	1,0	THF, Tolueno, DCLME, Acetona	Gradiente	30	DEEL	MAG, DAG, TAG, EsMAG e GL	KITTIRATTANPIBOON e KRISNANGKURA, 2008
TSK Sulpelco	300	7,8	5	1,0	THF	Isocrática	35	DIR	EsMAG	NAKAGAKI, <i>et al.</i> ;2008
Phenogel	300	7,8	5	1,0	0,5%THF em Tolueno	Isocrática	40	DIR	MAG, DAG, TAG, EsMAG	COSTA, 2022

GPC – Cromatografia de permeação em gel; HR – Alta resolução; L- Tamanho da coluna; d.i.- Diâmetro interno; d.p.- Diâmetro da partícula; UV – Ultravioleta; DEEL- Detector evaporativo de espalhamento de luz; DIR – Detector de índice de refração; GL- Glicerina; MAG-Monoacilgliceróis; DAG- Diacilgliceróis; TAG – Triacilgliceróis; EsMOG - Ésteres metílicos de óleo de girassol; EsEOG – Ésteres etílicos de óleo de girassol; EsMAG – Ésteres metílicos de ácidos graxos; DCLME – Diclorometano; ACT- Acetona; THF – Tetrahidrofurano.

Schoenfelder (2003) determinou MAG, DAG, TAG e GL por CET. Utilizou-se THF como fase móvel e detector por índice de refração (DIR). O diferencial neste artigo é a coluna Phenogel com material de elevado número de poros e alta eficiência. A matriz da fase estacionária é o polímero estireno-divinilbenzeno com ligações cruzadas. Estas colunas podem ser usadas a altas temperaturas (220°C).

Em 2004, Madras *et al.* estudaram a reação de transesterificação do óleo de girassol em metanol ou etanol supercrítico em várias temperaturas (200-400°C) a 200 bar. Neste trabalho, o produto reacional foi analisado por um sistema de CPG acoplado a um detector UV. Altas conversões (80 a 100%) foram obtidas quando a reação foi conduzida em metanol ou etanol supercrítico. Contudo, baixas conversões (27 a 30%) foram obtidas quando a reação foi catalisada por uma enzima em dióxido de carbono supercrítico. A curva analítica foi construída por injeção de várias amostras de biodiesel quimicamente sintetizado misturado com 20 µL de salicilato de isoamila (padrão interno) (MADRAS *et al.*, 2004).

Em 2006, Arzamendi *et al.* empregaram a cromatografia de exclusão por tamanho para analisar simultaneamente as quantidades totais de MAG, DAG, TAG, EsMAG, GL e metanol de amostras de biodiesel obtidas a partir de óleo de girassol. As análises foram realizadas a temperatura ambiente e apenas um pico para cada classe foi identificado, sendo possível uma quantificação fácil e precisa. Neste estudo utilizou-se uma composição variável de colunas obtendo uma separação melhor dos picos a série com 3 colunas (duas HR 2 e uma HR 0,5), da marca Styragel. As colunas da série HR, são utilizadas para separação de substâncias com baixo peso molecular, possuem partículas com área de 5 µm e podem ser utilizadas até 80°C. As colunas HR 0,5 separam moléculas com peso molecular até 1000. E as colunas HR 2 abrangem peso moleculares que variam de 500 a 20000. Neste trabalho os autores empregaram um volume de injeção de 50 µL com THF como fase móvel.

Kittirattanapiboon e Krisnangkura (2008) separaram e quantificaram MAG, DAG, TAG e EsMAG de uma mistura de padrões, empregando uma coluna phenogel (100 Å, 300 mm, 7,8 mm, 5 µm) usando tolueno, THF, acetona, diclorometano e ácido acético. O volume de injeção foi de 20 µL com detector evaporativo de espalhamento de luz. O limite de detecção foi de 0,1 mg/L e os valores dos coeficientes de determinação entre (1 e 100 mg) de cada classe de compostos foi de 0,99 (KITIRATTANAPIBOON E KRISNANGKURA, 2008). A **Figura 9** apresenta os cromatogramas de uma mistura de padrões de TAG, DAG,

MAG, EsMAG e ácidos graxos livres obtidos no trabalho (KITIRATTANAPIBOON E KRISNANGKURA, 2008).

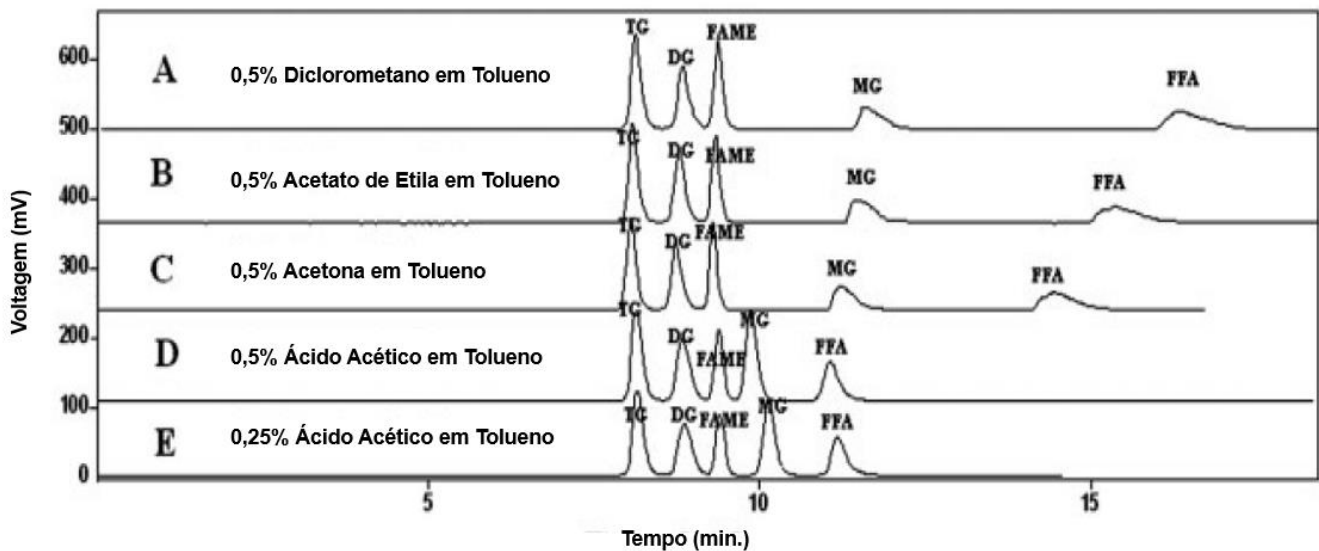


Figura 9. Cromatogramas de uma mistura de padrões de TG (triacilgliceróis), MG (monoacilgliceróis), DG (diacilgliceróis), FAME (ésteres metílicos de ácidos graxos) e FFA (ácidos graxos livres). Fase móvel: A - 0,5 % de diclorometano em tolueno, B – 0,5 % de acetato de etila em tolueno, C – 0,5 % de acetona em tolueno, D – 0,5 % de ácido acético em tolueno e 0,25 % de ácido acético em tolueno (KITIRATTANAPIBOON E KRISNANGKURA, 2008).

Em 2008, Nakagaki *et al.* utilizaram a CPG para caracterizar e monitorar ésteres metílicos, MAG, DAG e TAG, obtidos pela reação de transesterificação de óleo de soja, provenientes da catálise heterogênea, usando molibdato de sódio anidro como catalisador. Empregaram duas colunas em séries hidrofóbicas TSK - gel com tamanhos de partículas de 50 nm e 10 nm da marca Supelco, descritas como (G2000 – XHL) e (G1000 – HXL), respectivamente. A temperatura das análises foi de 35°C, com fluxo de 1 mL e foram eluídas com THF. A **Figura 10** apresenta os cromatogramas obtidos por CPG neste trabalho. A presença dos TAG foi identificada em (14,2 min), dos DAG em (14,9 min), dos MAG em (16,2 min) e dos ésteres metílicos em (17,5 min) (NAKAGAKI *et al.*, 2008).

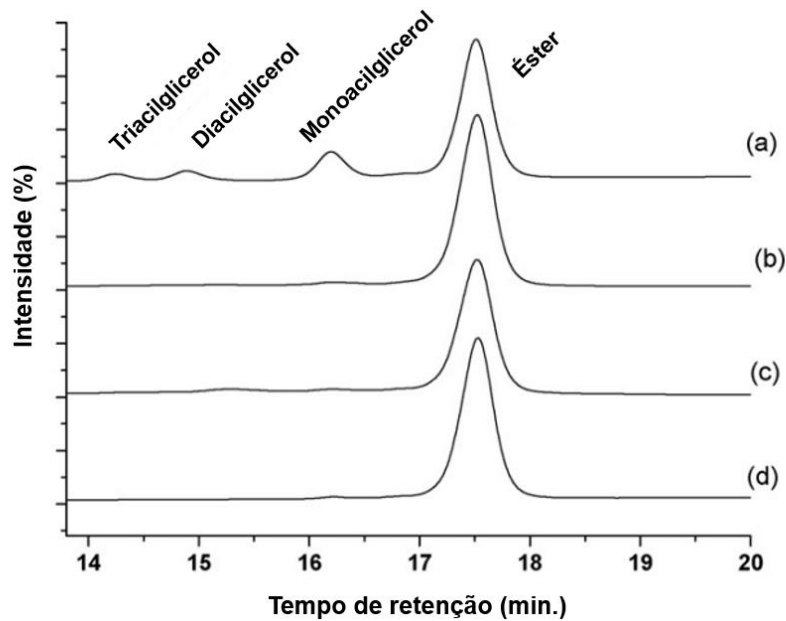


Figura 10. Cromatogramas obtidos por CPG. (a) ésteres metílicos de óleo de soja refinados em 3h de reação com uma razão molar álcool/óleo de (30:1) (b) ésteres metílicos de óleo de soja refinado em 8h de reação com uma razão molar de (54:1). (c) ésteres metílicos de fritura de óleo de soja em 8h de reação com uma taxa de conversão de (30:1). (d) ésteres metílicos de óleos de soja refinados em 3h de reação e com uma taxa de conversão de (54:1) (NAKAGAKI *et al.*, 2008)

Costa (2022) utilizou a cromatografia de permeação em gel (GPC) para analisar e quantificar simultaneamente os constituintes MAG, DAG, TAG e EsMAG presentes no biodiesel em amostras de verificação, utilizando uma coluna Phenomenex de dimensões (300 mm x 7,80 mm), fase estacionária Phenogel (5 μ m de tamanho de partícula e com 100 Å de diâmetro de poro) e 0,5% de THF em tolueno como fase móvel. As análises foram realizadas a uma temperatura constante de 40,0 ° C, a uma vazão de 1,0 mL / min. e utilizando o detector de índice de refração. Todas as amostras foram injetadas em triplicata, com volumes de injeção de 100 μ L, e o tempo de duração da corrida foi de 15 min. A **Figura 11** representa os cromatogramas obtidos por cromatografia de permeação em gel (GPC) neste trabalho. A presença de EsMAG foi identificada entre (7,9 e 8,8 min.), de TAG entre (6,7 e 7,1 min.), de DAG entre (7,2 e 7,8 min.) e de MAG entre (9,2 e 9,8 min.).

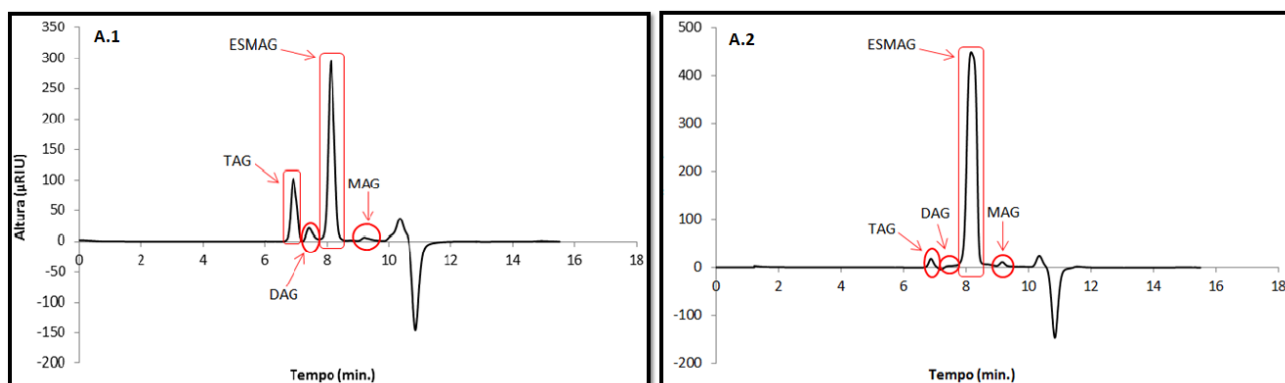


Figura 11. Cromatogramas obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, do (A.1) produto de transesterificação de baixa conversão e (A.2) produto de transesterificação de alta conversão, onde: MAG, DAG, TAG e EsMAG são, respectivamente, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis e ésteres metílicos de ácidos graxos (COSTA, 2022).

A metodologia utilizada no presente trabalho, para a determinação do teor de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes em amostras de biodieséis comerciais, foi desenvolvido por Costa (2022).

Comparando a **Figura 11** acima com a **Figura 5** (cromatograma obtido por CG) e **Figura 6** (cromatograma obtido por CLAE), observa-se que as **Figuras 5 e 6** ilustram cromatogramas com vários picos, sendo cada um deles referente a um éster presente na amostra de biodiesel, tornando sua identificação e quantificação mais complexa. Já o cromatograma obtido por CET apresenta uma vantagem significativa. A especificação requer apenas a determinação do teor total de ésteres, eliminando a necessidade de identificar a proporção de cada tipo de éster na amostra. A CET exibe um único pico que representa todos os ésteres presentes no biodiesel, o que é significativamente mais simples e otimiza a identificação e quantificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos, demonstrando assim um grande potencial para substituir a técnica de referência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes e Solventes

Para as análises por CET foram utilizados o solvente 0,5% tetrahidrofurano (THF) em tolueno da Biograde (Goiás, Brasil), com grau de pureza HPLC e o padrão de oleato de metila foi obtido pela Sigma-Aldrich, com pureza >99%.

Para as análises por CG foram utilizados os solventes n-heptano e piridina da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), com grau de pureza P.A. Os padrões de monopalmitina, monooleína, monoestearina, dioleína, trioleína, butanotriol e tricaprina foram obtidos da Sigma-Aldrich, com pureza >99%. O agente derivatizante n-metil-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) foi obtido da Pierce Chemical.

As amostras de produto de transesterificação e de biodieseis comerciais utilizadas para desenvolver presente projeto se encontram na **Tabela 4**. As amostras de produto de transesterificação foram produzidas no laboratório LABCOM (EQ-UFRJ) pela metodologia descrita por Miranda e Moura (2016).

Tabela 4. Amostras de produto de transesterificação e de biodieseis comerciais com suas respectivas matrizes.

Amostra	Constituição em oleaginosas
Produto de Transesterificação	Soja
Produto de Transesterificação	Girassol
Produto de Transesterificação	Canola
Biodiesel Comercial T1	100% óleo de soja
Biodiesel Comercial T2	100% óleo de soja
Biodiesel Comercial T3	30% óleo de soja, 30% óleo de fritura, 20% sebo bovino e 20% sebo suíno
Biodiesel Comercial A1	100% óleo de girassol
Biodiesel Comercial A2	55% óleo de soja, 25% óleo de fritura, 10% sebo bovino e 10% sebo suíno
Biodiesel Comercial A3	100% óleo de soja
Biodiesel Comercial A4	100% óleo de soja
Biodiesel Comercial A5	100% óleo de soja

4.2. Preparo das soluções padrão de EsMAG para construção da curva analítica

Neste trabalho foram preparadas 5 amostras padrão de oleato de metila (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$ pureza), solubilizadas em 0,5% THF em tolueno, nas concentrações de 79,7% mássica (concentração 1 – C1), 85,4% mássica (concentração 2 – C2), 88,8% mássica (concentração 3 – C3), 94,8% mássica (concentração 4 – C4) e 100% mássica (concentração 5 – C5) para a construção da curva analítica. As 5 amostras padrão foram diluídas a 5% volumétrica em 0,5% tetrahidrofurano (THF) em tolueno, para análise por CET.

4.3. Análise de EsMAG pelo método de referência (cromatografia gasosa)

A análise de EsMAG, por CG, foi realizada segundo a norma EN14103, em um cromatógrafo da Agilent (modelo 7890-A), com injetor split a 250°C e razão de fluxo 100:1. O forno da coluna foi programado nas seguintes condições: 60°C (2 min), 10°C/min até 200°C e 5°C/min até 240°C, mantido por 7 min. Foi utilizada uma coluna Agilent DB-WAX, empacotada com polietileno glicol de alta polaridade, 30,0 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de diâmetro de partícula. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio (99,9% pureza) com vazão constante de 2 mL/min. O detector utilizado foi o de ionização de chama, com a temperatura de 250°C, com os gases, hidrogênio na vazão de 30 mL/min, ar na vazão de 300 mL/min e 30 mL/min de nitrogênio; e como solvente de lavagem o tolueno.

Para analisar cada amostra empregada neste estudo, utilizou-se 100 mg de nonadecanoato de metila (C19), 100 mg de amostra e 10 mL de tolueno. As amostras foram injetadas em duplicata, com um volume de injeção de 1,0 μL . O tempo total gasto para análise completa foi de 35 min. A integração deve ser realizada a partir do pico do éster metílico do ácido C6:0 até o pico do éster metílico C24:1 levando em consideração todos os picos.

Caso o éster metílico de ácido nonadecanóico não esteja presente na amostra de EsMAG, ele pode ser usado como padrão interno. O teor de éster (C), expresso como porcentagem de massa, é calculado usando a **Equação 1**.

$$C = \frac{\sum(A_X \cdot R_X) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{W_{EI}}{W} \times P \times 100$$

Equação 1. Cálculo do teor de EsMAG segundo a norma EN14103.

Onde:

A_X é a área do pico do éster metílico individual X na amostra de teste (de C6:0 a C24:1);

R_X é o fator de correção do detector de ionização de chama teórico para EsMAG X relativo para o padrão interno (C19:0);

A_{EI} é a área do pico correspondente ao éster metílico do ácido nonadecanóico;

P é a pureza do éster metílico do ácido nonadecanóico;

W_{EI} é o peso, em miligramas, do éster metílico do ácido nonadecanóico sendo usado como padrão;

W é o peso, em miligramas, da amostra de teste.

4.4. Análise de EsMAG por cromatografia de exclusão por tamanho (método adaptado no presente trabalho)

4.4.1. Estudo de diluição das amostras de biodiesel

O estudo de diluição foi realizado por meio da análise de produtos de transesterificação de diferentes oleaginosas (soja, girassol e canola) e amostras de biodiesel comercial (T1, T2 e T3) com 5% (v/v) de diluição e 100 µL de injeção, volume descrito na metodologia de Costa (2022). Em seguida, foi realizado um estudo de diluição e volume de injeção utilizando uma amostra de biodiesel comercial A1 (100% óleo de girassol). Foram testadas concentrações de 5% (v/v) e 2,5% (v/v), com volumes de injeção de 10, 20 e 30 µL, para observar o perfil do pico cromatográfico.

4.4.2. Estudo de volume de injeção das amostras de biodiesel

Com a diluição em 5% (v/v), os volumes de injeção utilizados foram de 20 e 30 μL e todas as amostras foram injetadas em triplicata. O primeiro ensaio foi realizado com o padrão de linolenato de metila, para a construção de uma curva analítica, com concentrações baseadas na norma NBR 15764, que utiliza concentrações de 1%, 4%, 10%, 40%, 90% e 99% em massa. O segundo ensaio foi realizado com o padrão de oleato de metila, também para a construção de uma curva analítica, utilizando concentrações de 80%, 85%, 90%, 95% e 100% em massa.

4.4.3. Análise de ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia de exclusão por tamanho

O sistema utilizado foi o Thermo Scientific Ultimate 3000 HPLC, composto por uma bomba quaternária Dionex Ultimate 3000, um detector IR ERC-RefractorMax 520 e um amostrador automático WPS-3000 com um loop de amostra de 100,0 μL . A análise foi realizada usando uma coluna Phenomenex com dimensões de 300 mm x 7,80 mm, contendo uma fase estacionária Phenogel com tamanho de partícula de 5 μm e diâmetro de poro de 100 Å. A fase móvel consistia em 0,5% de tetrahydrofurano (THF) em tolueno. As análises ocorreram a uma temperatura constante de 40,0°C (temperatura do forno da coluna), com uma vazão de 1,0 mL/min. As amostras de biodiesel comercial foram diluídas a 5% volumétrica em 0,5% tetrahydrofurano (THF) em tolueno. Em seguida, foram filtradas usando um filtro de seringa Millex obtido pela Millipore (São Paulo, Brasil) feito de politetrafluoretileno (PTFE), com uma membrana de poro de 0,45 μm . Cada amostra foi injetada em triplicata, com um volume de injeção de 20 μL e o tempo total da corrida foi de 15 minutos.

4.5. Validação do método de cromatografia de exclusão por tamanho

A validação de métodos analíticos tem sido difundida nos âmbitos acadêmico e industrial, como uma ferramenta para assegurar que o método proposto atenda às exigências das aplicações analíticas, garantindo confiabilidade e credibilidade dos resultados obtidos (ANVISA, 2017).

A validação do método proposto foi seguiu as diretrizes do Conselho Internacional de Harmonização – ICH (2005), Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166 (ANVISA, 2017) e Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos (INMETRO, 2020). Foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão (determinada pela recuperação) e precisão (determinada pelo desvio padrão relativo em condições de repetibilidade).

4.5.1. Determinação da linearidade

A linearidade mede a variação da tendência para diferentes valores de referência em uma determinada faixa de trabalho, está associada a quanto um método fornece resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de um intervalo especificado (ICH, 2005).

Para a avaliação da linearidade, foram injetadas soluções padrão em triplicata para as 5 concentrações da curva analítica. Observou-se o gráfico resultante a partir das áreas em função das concentrações conhecidas e verificou-se a relação linear pela equação da reta (**Equação 2**), onde y é a área do pico, x é a concentração do analito, a é o coeficiente linear e b é o coeficiente angular.

$$y = a + bx$$

Equação 2. Equação da reta

A linearidade permite estimar a qualidade da curva analítica, quanto mais próximo de 1,0 for o coeficiente de determinação (R^2), menor será a dispersão dos dados experimentais e a incerteza nas medidas (RIBANI *et al.*, 2004).

4.5.2. Determinação do limite de detecção

O limite de detecção (LD) pode ser definido como o menor valor detectado em confiabilidade de precisão aceitável, em função do ruído do sistema (INMETRO, 2020). Esta métrica está diretamente relacionada com a sensibilidade de detecção do método. Pode ser calculado pela **Equação 3**, onde s é o desvio padrão da menor concentração medida e b é o coeficiente angular da equação da reta obtida pela curva analítica.

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

Equação 3. Equação para determinação do limite de detecção.

4.5.3. Determinação do limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) pode ser definido como a menor concentração de uma espécie de interesse que pode ser determinado quantitativamente em confiabilidade de precisão e exatidão (INMETRO, 2020). Pode ser calculado pela **Equação 4**, onde s é o desvio padrão da menor concentração medida e b é o coeficiente angular da equação da reta obtida pela curva analítica.

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

Equação 4. Equação para determinação do limite de quantificação.

4.5.4. Determinação da precisão

A precisão representa a concordância entre os ensaios em replicata de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI *et al.*, 2004). Neste trabalho, a precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi verificada pela determinação de três concentrações diferentes em triplicata, sendo estas C_1 – 79,7% mássica, C_3 – 88,8% mássica e C_5 – 100% mássica para a curva de oleato de metila. Os resultados da precisão podem ser expressos como coeficiente de variação (CV%), também conhecido como desvio-padrão relativo (DPR), calculado pela **Equação 5**, onde s é o desvio padrão da menor concentração medida e C é a concentração medida.

$$CV (\%) = \frac{s}{C} \times 100$$

Equação 5. Equação para determinação da precisão (coeficiente de variação).

4.5.5. Determinação da exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre as replicatas obtidas em um determinado ensaio e um valor de referência tido como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004). A

exatidão foi verificada pela determinação de três concentrações diferentes em triplicata, sendo estas C_1 – 79,7% mássica, C_3 – 88,8% mássica e C_5 – 100% mássica para a curva de oleato de metila. Os resultados da exatidão podem ser reportados em termos de recuperação, R (%), segundo a **Equação 6**, onde C_{obs} é a concentração observada e C_{esp} é a concentração esperada.

$$R (\%) = \frac{C_{obs}}{C_{esp}} \cdot 100$$

Equação 6. Equação para determinação da exatidão (recuperação).

4.6. Tratamento estatístico

4.6.1. Teste de Grubb's

Com o objetivo de verificar a presença de valores aberrantes (*outliers*), foi empregado o teste de Grubb's simples. Este teste é baseado na diferença entre a média da amostra e o valor aberrante, considerando o desvio-padrão (**Equação 7**). O teste de Grubb's é primeiramente realizado verificando a existência de um valor disperso em cada extremidade do conjunto. Se nesta primeira análise, um dos dois valores for considerado disperso, ele é rejeitado, retirado do conjunto e um novo teste, verificando a existência de um valor disperso em cada extremidade do conjunto, e realizado assim sucessivamente até não se verificar a presença de valor aberrante (MILLER, 2010). Na **Equação 7**, G_{calc} é o valor de G calculado, x_i é o valor suspeito de ser aberrante, x é a média da amostra e s é o desvio-padrão da medida.

$$G_{calc} = \frac{|(x_i - x)|}{s}$$

Equação 7. Equação para determinação do valor de G_{calc}

Determinado o valor de G_{calc} , compara-se esse valor ao G_{tab} (**Anexo A**). Se o valor de G_{calc} for maior que o valor de G_{tab} ($G_{calc} > G_{tab}$), pode-se concluir que o valor é aberrante (*outlier*) e, portanto, deve ser rejeitado. Se o valor de G_{calc} for menor que o valor de G_{tab} ($G_{calc} < G_{tab}$), pode-se concluir que o valor não é aberrante (MILLER, 2010).

4.6.2. Teste de Cochran

O teste de Cochran é um teste estatístico que tem o objetivo de avaliar a homogeneidade das variâncias, verificar se existem diferenças significativas entre as variâncias de um determinado grupo de amostras, podendo ser calculado pela **Equação 8**. O C_{calc} é o valor de C calculado, s_{max}^2 é a maior valor variância, $\sum_{i=1}^k s_i^2$ é o somatório de todas as variâncias das amostras.

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

Equação 8. Equação para determinação do valor de C_{calc}

O valor de C_{calc} deve ser comparado ao valor de C_{tab} (**Anexo B**). Se o valor de C_{calc} for menor que o valor de C_{tab} ($C_{calc} < C_{tab}$), pode-se concluir que se trata de um comportamento homocedástico (variâncias constantes). Se o valor de C_{calc} for maior que o valor de C_{tab} ($C_{calc} > C_{tab}$), pode-se concluir que se trata de um comportamento heterocedástico (variâncias não constantes) (MILLER, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação dos parâmetros de volume de injeção e diluição da amostra

5.1.1. Estudo de diluição das amostras de biodiesel

Na metodologia desenvolvida por Costa (2022), foram utilizadas amostras de verificação com diferentes concentrações para analisar simultaneamente os teores de EsMAG, MAG, DAG e TAG. Neste trabalho, com o objetivo de analisar apenas o teor de EsMAG, foi necessário ajustar alguns parâmetros, incluindo a definição de um valor de diluição adequado para preparar as amostras.

Os cromatogramas dos produtos de transesterificação de diferentes oleaginosas (soja, girassol e canola) (**Figura 12**) e amostras de biodiesel comercial (T1: 100% óleo de soja; T2: 100% óleo de soja e; T3: 30% óleo de soja, 30% óleo de fritura, 20% sebo bovino e 20% sebo suíno) (**Figura 13**), demonstraram um perfil de picos assimétricos e com intensidade elevada, sugerindo a necessidade de aumentar a diluição da amostra.

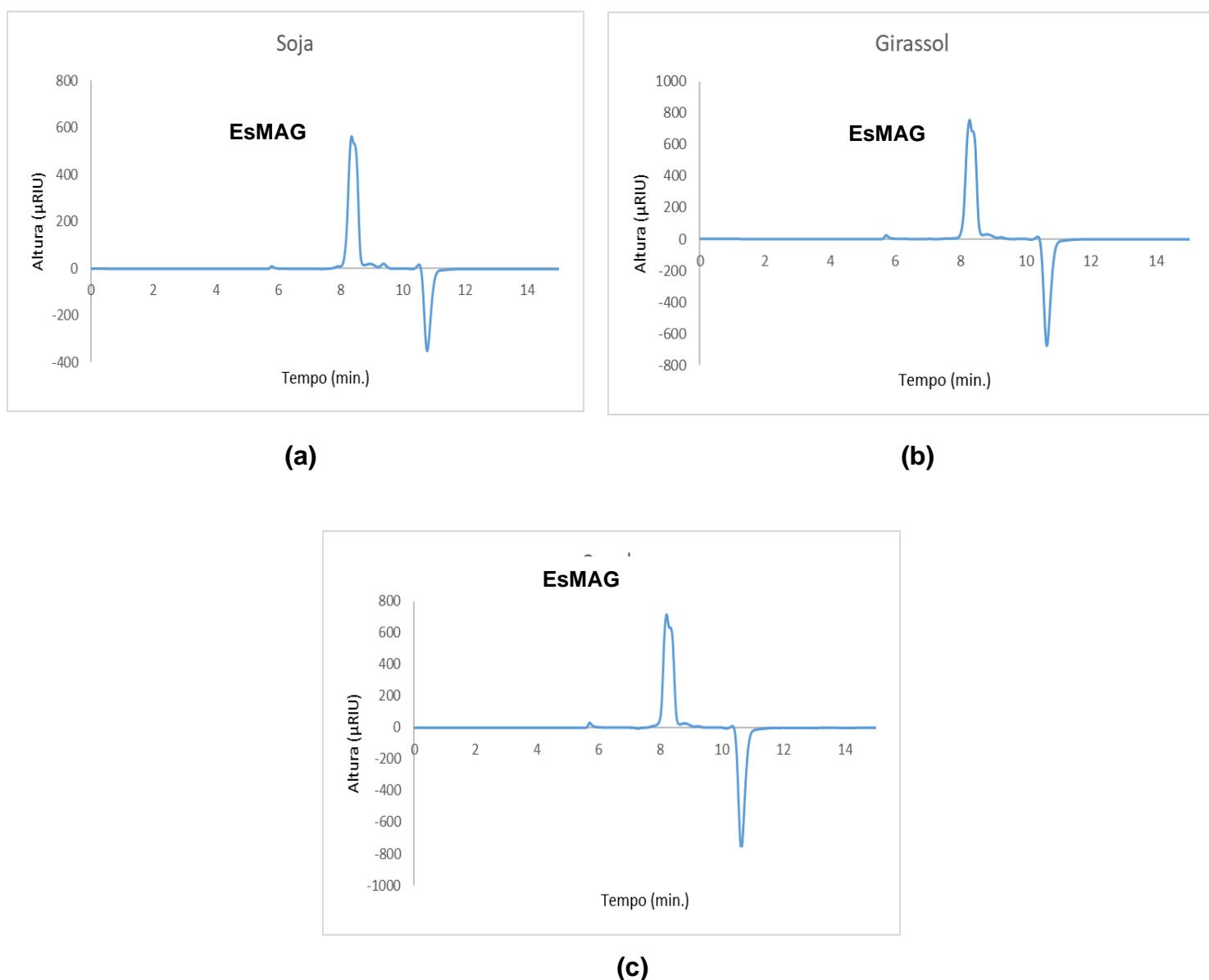
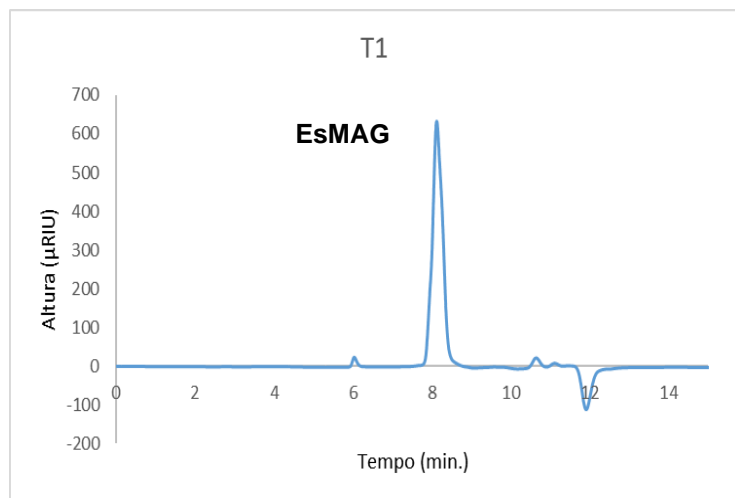
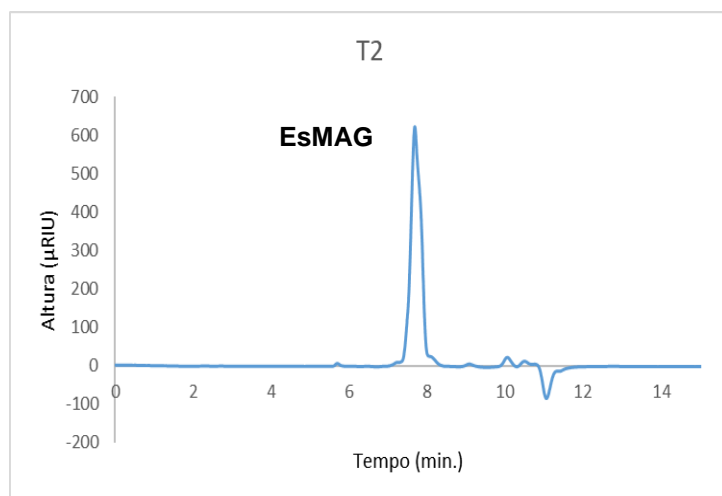


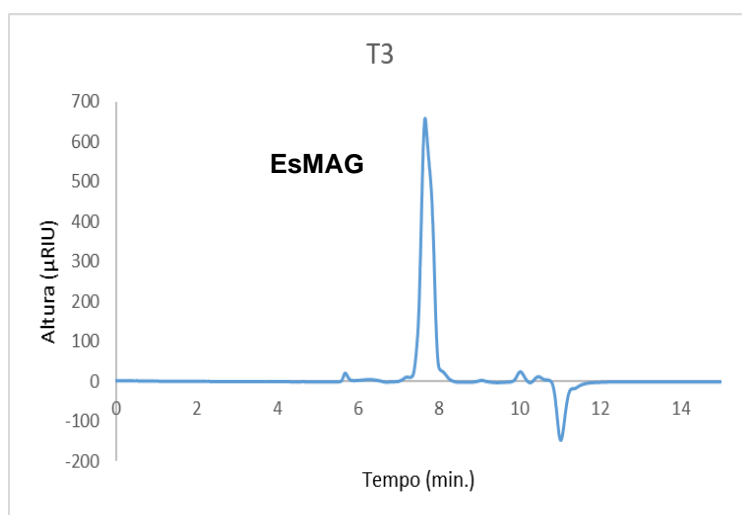
Figura 12. Cromatogramas, obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, de produtos de transesterificação de: **(a)** soja; **(b)** girassol e; **(c)** canola, utilizando diluição 5% (v/v) e 100 μL de injeção, onde: EsMAG são os ésteres metílicos de ácidos graxos.



(a)



(b)



(c)

Figura 13. Cromatogramas, obtido por cromatografia de exclusão por tamanho, de amostras de biodiesel comercial sendo: **(a)** T1: 100% óleo de soja; **(b)** T2: 100% óleo de soja e; **(c)** T3: 30% óleo de soja, 30% óleo de fritura, 20% sebo bovino e 20% sebo suíno; utilizando diluição 5% (v/v) e 100 µL de injeção, onde: EsMAG são os ésteres metílicos de ácidos graxos.

Em seguida, foi realizado um estudo de diluição (5% (v/v) e 2,5% (v/v)) e volume de injeção (10, 20 e 30 μL) utilizando uma amostra de biodiesel comercial A1 (100% óleo de girassol) (**Figura 14**). Observou-se que as análises realizadas com concentração de 2,5% (v/v) apresentavam intensidades muito baixas, consequentemente áreas muito pequenas, ao ponto de algumas amostras de biodiesel comercial não apresentarem o pico referente aos EsMAG por estarem muito diluídas, impossibilitando a identificação e quantificação de EsMAG. Em contrapartida, a amostra com concentração de 5% (v/v) com os volumes de 20 e 30 μL apresentaram picos simétricos e com intensidades satisfatórias, permitindo a continuidade do estudo com esses dois volumes.

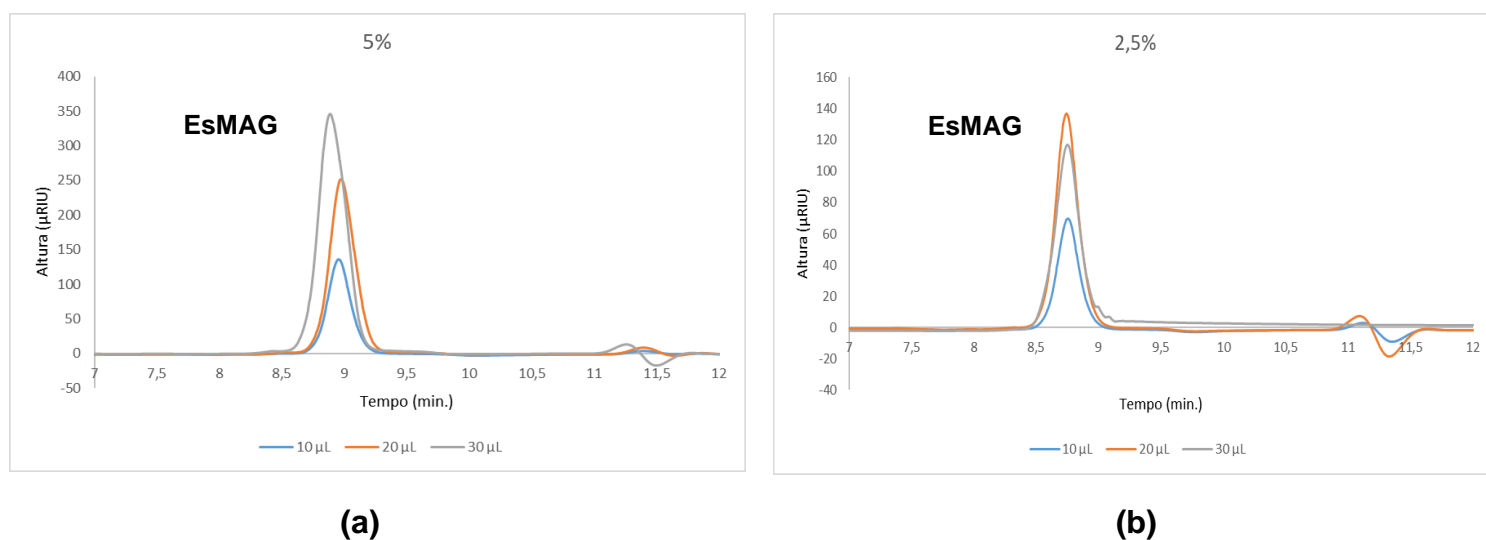


Figura 14. Cromatogramas, obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, de biodiesel comercial A1 (100% óleo de girassol) com: **(a)** diluição 5% (v/v) e volume de injeção de 10, 20 e 30 μL ; **(b)** diluição 2,5% (v/v) e volume de injeção de 10, 20 e 30 μL , onde: EsMAG são os ésteres metílicos de ácidos graxos.

5.1.2. Estudo de volume de injeção das amostras de biodiesel

As curvas analíticas de linolenato de metila e seus respectivos cromatogramas estão disponíveis na **Figura 15**. O seu preparo foi baseado no preparo de soluções padrão da norma NBR 15764 (**Apêndice A – Tabela 1**). A linearidade das curvas apresentou valores satisfatórios ($R^2 = 0,9948$ e $R^2 = 0,9955$), porém, observou-se que os pontos da curva não

são equidistantes entre si, não garantindo linearidade em todo o seu intervalo, já que os pontos da curva estão concentrados no início (menores concentrações) e no final da curva (maiores concentrações). Além disso, as amostras apresentaram áreas muito pequenas em ambos os volumes de injeção.

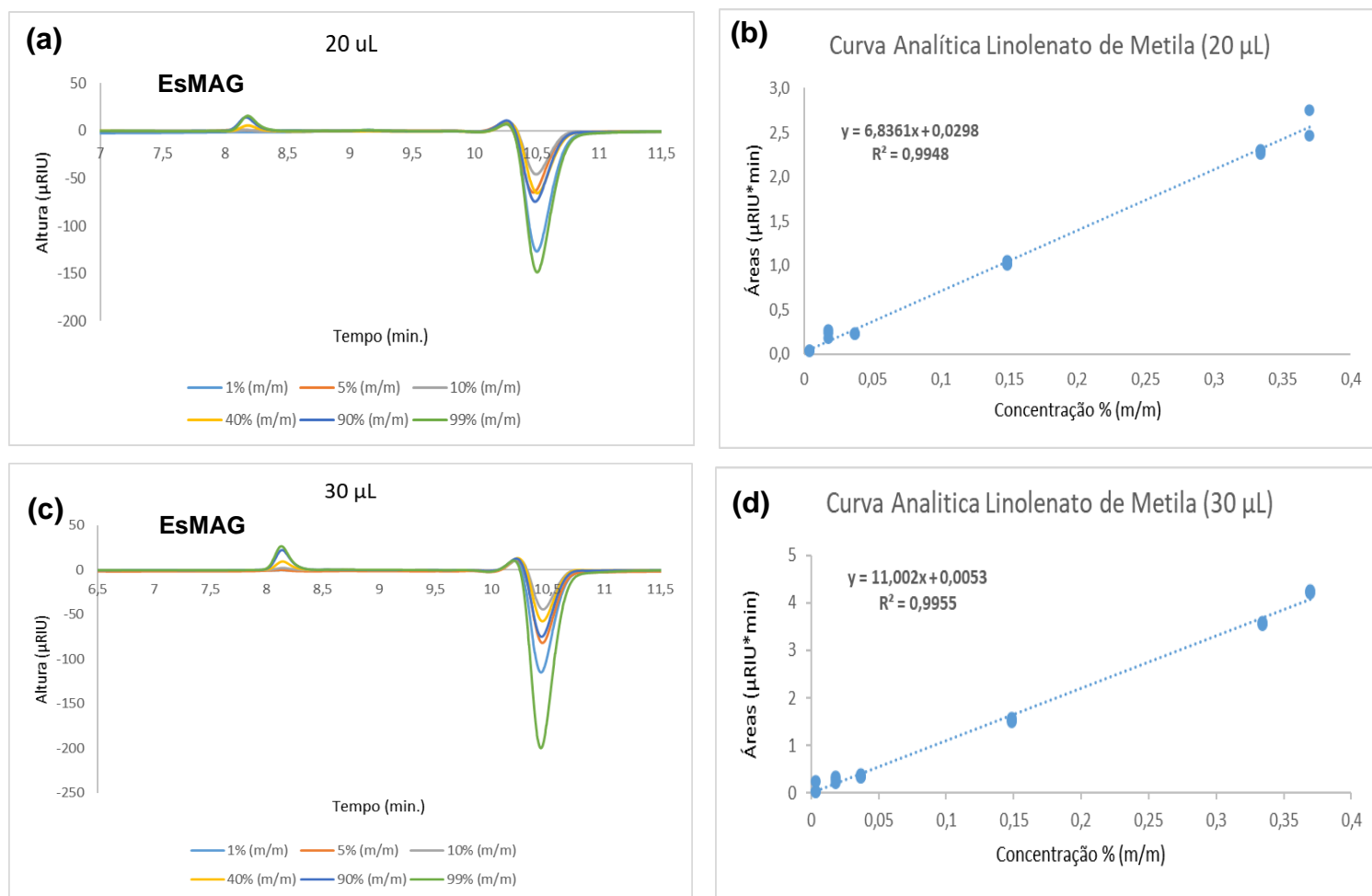


Figura 15. (a) e (c) Cromatogramas, obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, de curva analítica de linolenato de metila sendo: **(a)** 20 µL e **(c)** 30 µL; **(b) e (d)** Curvas analíticas de linolenato de metila com concentrações de 1,0%, 4,8%, 9,9%, 40,0%, 89,9% e 99,5% (m/m), sendo: **(b)** volume de injeção de 20 µL e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9948; **(d)** volume de injeção de 30 µL e $R^2 = 0,9955$; e EsMAG os ésteres metílicos de ácidos graxos.

Posteriormente, foi realizado um ensaio com o padrão de oleato de metila e utilizou-se concentrações de 74,6%, 86,6%, 90,1%, 93,6% e 100% (m/m) (**Apêndice A – Tabela 2**). O padrão de oleato de metila foi escolhido por apresentar um menor valor no mercado, comparado aos padrões de linoleato de metila e linolenato de metila. Essas concentrações foram escolhidas a fim de apresentar pontos na curva equidistantes entre si e ser uma faixa de concentração próxima ao teor de éster determinado pela especificação (96,5% em massa). As curvas analíticas de oleato de metila e seus respectivos cromatogramas estão disponíveis na **Figura 16**. Observando o perfil cromatográfico das curvas analíticas, as amostras com 30 μL de injeção apresentaram picos assimétricos e exibiram um coeficiente de determinação menor que 0,90 ($R^2 = 0,8633$). Valores acima de 0,90 indicam boa linearidade, pois quanto mais próximo de 1,0, maior a probabilidade de uma relação linear, resultando em menor dispersão dos pontos experimentais e menor incerteza nos coeficientes de regressão (INMETRO, 2020). Em contraste, as amostras com 20 μL de injeção apresentaram comportamento linear e um coeficiente de determinação de $R^2 = 0,9587$, sendo esse o volume escolhido para a metodologia deste trabalho.

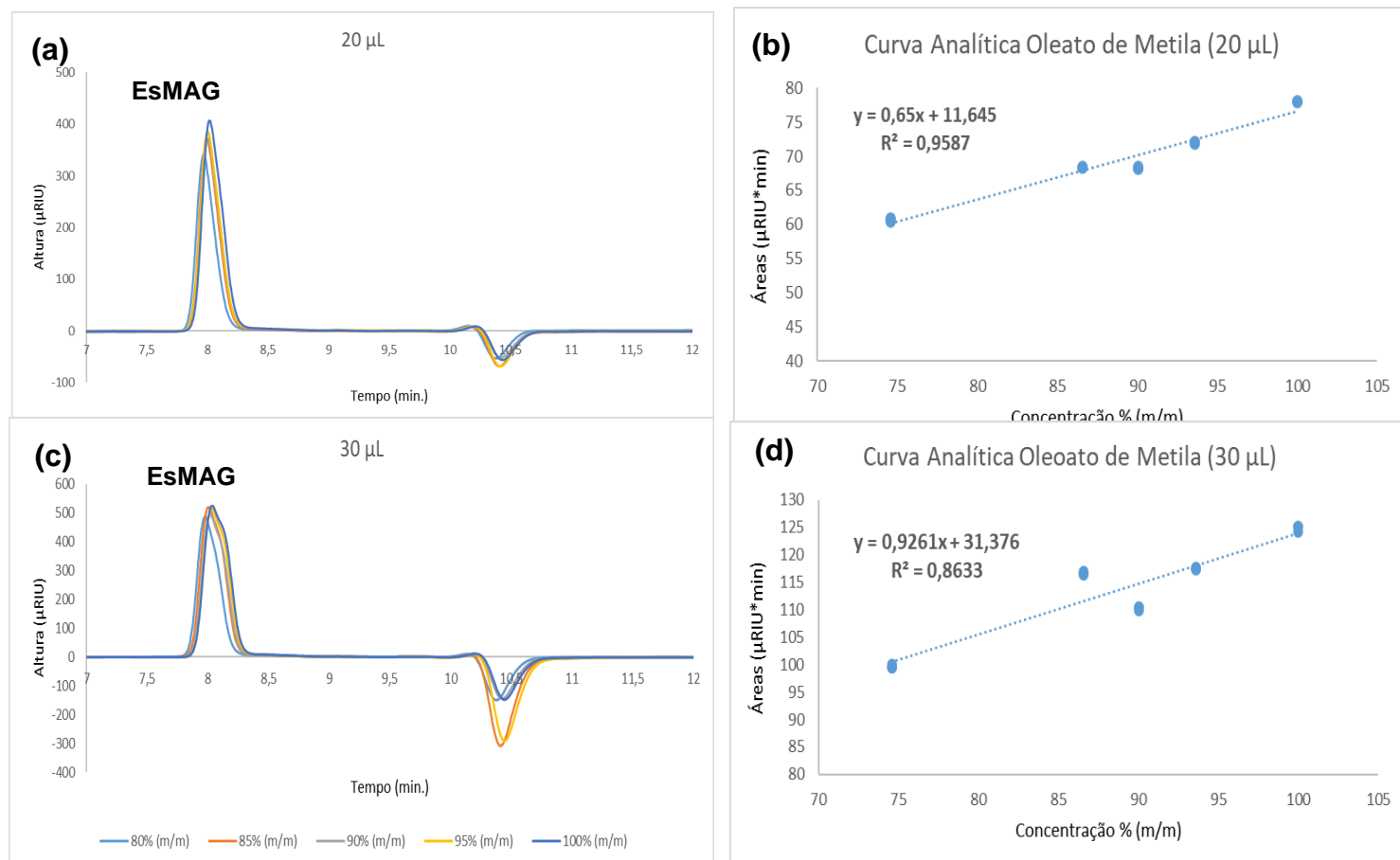


Figura 16. (a) e (c) Cromatogramas, obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, do primeiro teste de curva analítica de oleato de metila sendo: **(a)** 20 μL e **(c)** 30 μL ; **(b) e (d)** Curvas analíticas de oleato de metila do primeiro teste com concentrações de 74,6%, 86,6%, 90,1%, 93,6% e 100% (m/m), sendo: **(b)** volume de injeção de 20 μL e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9587; **(d)** volume de injeção de 30 μL e $R^2 = 0,8633$; e EsMAG os ésteres metílicos de ácidos graxos.

5.2. Análise das amostras de biodiesel comercial por cromatografia de exclusão por tamanho

Cinco amostras de biodiesel comercial foram analisadas por CET como mostra a **Tabela 5**, em que relaciona seu teor de EsMAG (% mássica), a composição da amostra e os ésteres majoritários. Os cromatogramas dessas amostras são apresentados na **Figura 17**.

Tabela 5. Teor de EsMAG (% mássica) das cinco amostras de biodiesel comercial analisadas por cromatografia de exclusão por tamanho.

Amostra	CET ¹
A1	87,4 \pm 0,6
A2	91,7 \pm 0,1
A3	86,82 \pm 0,1
A4	78,68 \pm 0,1
A5	87,89 \pm 0,6

CET – Cromatografia de Exclusão por Tamanho; EsMAG – Ésteres metílicos de ácidos graxos;

¹Incerteza padrão tipo A estimada por meio do desvio padrão de três determinações em condições de repetibilidade.

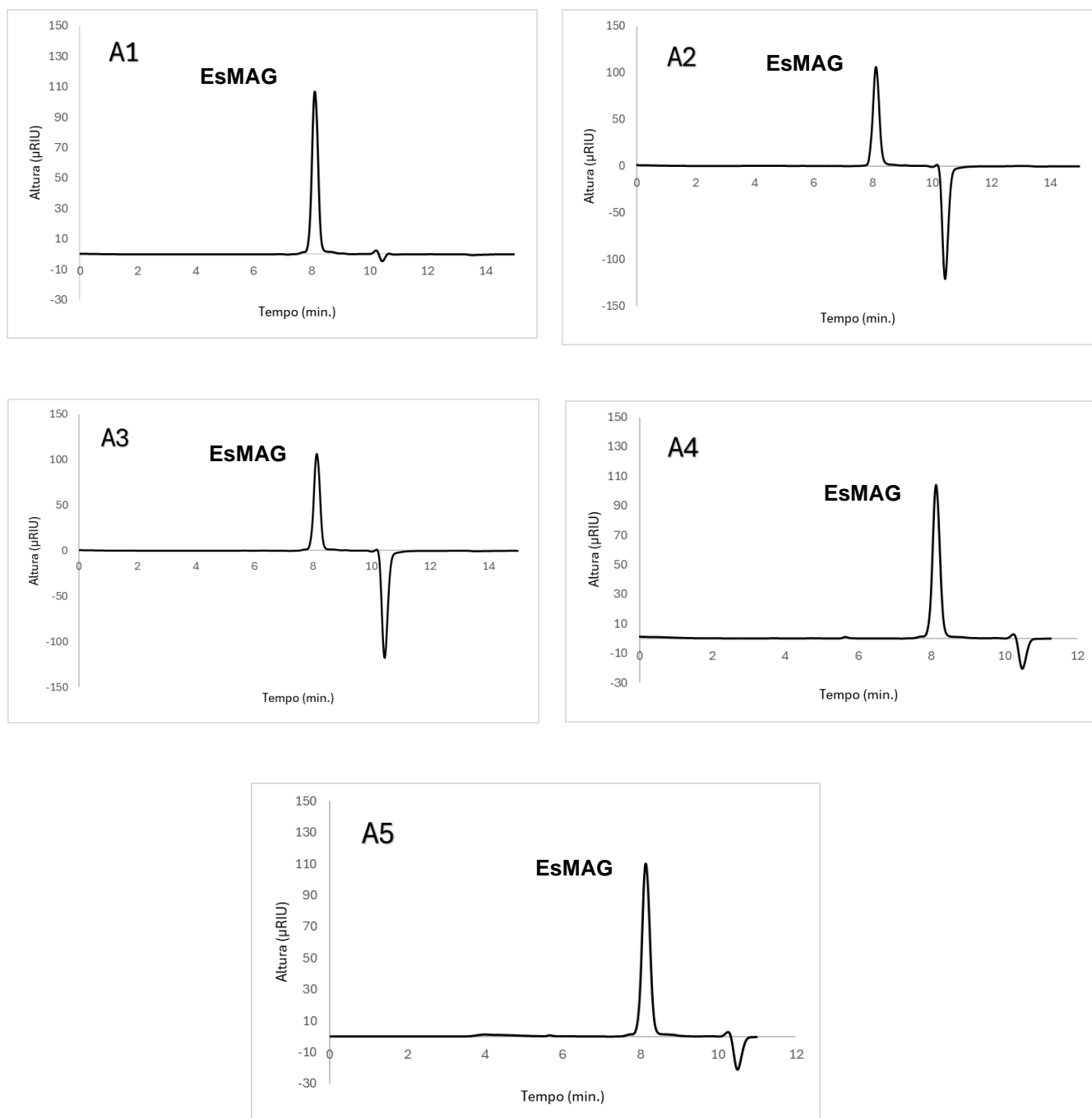


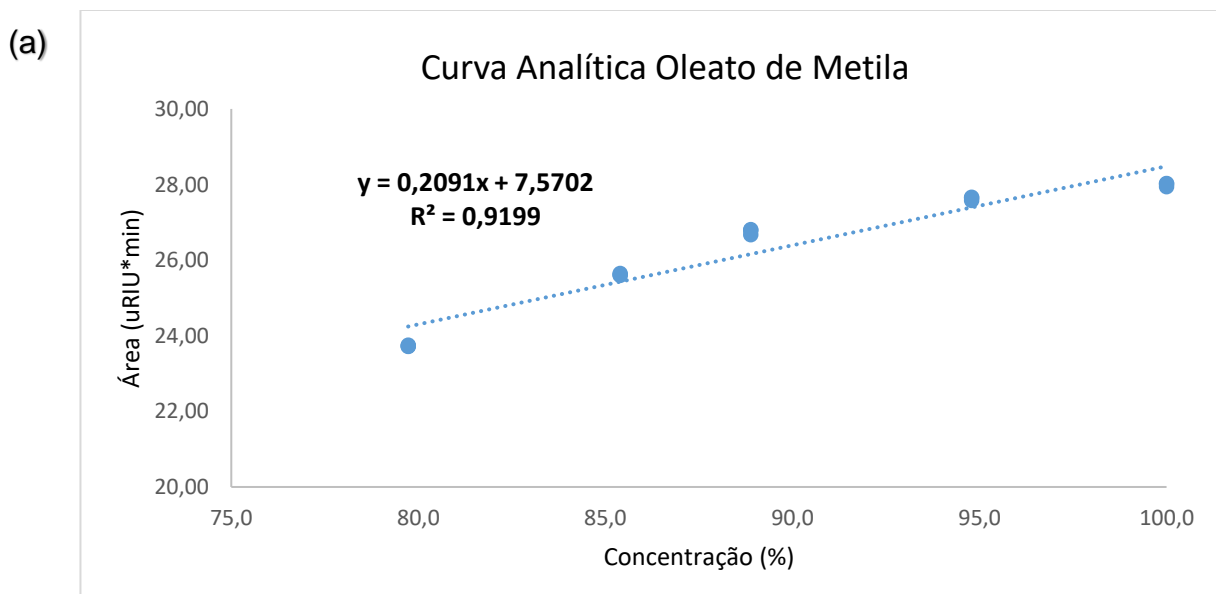
Figura 17. Cromatogramas, obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, do (A1) biodiesel comercial 100% óleo de girassol; (A2) biodiesel comercial proveniente da mistura de óleos (55% óleo de soja, 25% óleo de fritura, 10% sebo bovino e 10% sebo suíno); (A3) e (A4) biodieseis comerciais 100% óleo de soja; e (A5) biodiesel comercial 100% óleo de soja, onde: EsMAG são os ésteres metílicos de ácidos graxos.

A **Figura 17** apresenta os cromatogramas com um pico bastante intenso referente aos EsMAG, com um tempo de retenção de 8,1 minutos. Devido à alta conversão, em EsMAG, das amostras de biodiesel, não é possível visualizar os picos referentes aos MAG, DAG e TAG, conforme observado nos cromatogramas da **Figura 11**. Nos cromatogramas obtidos por CET, os picos têm intensidades proporcionais às suas concentrações.

5.3. Validação do método por cromatografia de exclusão por tamanho

Foram determinados os seguintes parâmetros de validação: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão (determinada pela recuperação) e precisão (determinada pelo desvio padrão relativo, em condições de repetibilidade).

Para a confecção da curva analítica de teor de EsMAG (% mássica) versus área do pico (μ RIU.min), as amostras padrão de oleato de metila foram analisadas por CET, em triplicata, segundo procedimento descrito no **item 4.3**. A curva analítica para quantificação do teor de EsMAG se encontra na **Figura 18.a**, com concentrações de 79,7%, 85,4%, 88,9%, 94,8% e 100% (m/m) (**Apêndice A – Tabela 3**). Na **Figura 18.b**, encontra-se o cromatograma, obtido por CET, da curva analítica, em que é observado um aumento de área proporcional do pico do EsMAG à medida que a sua concentração aumenta.



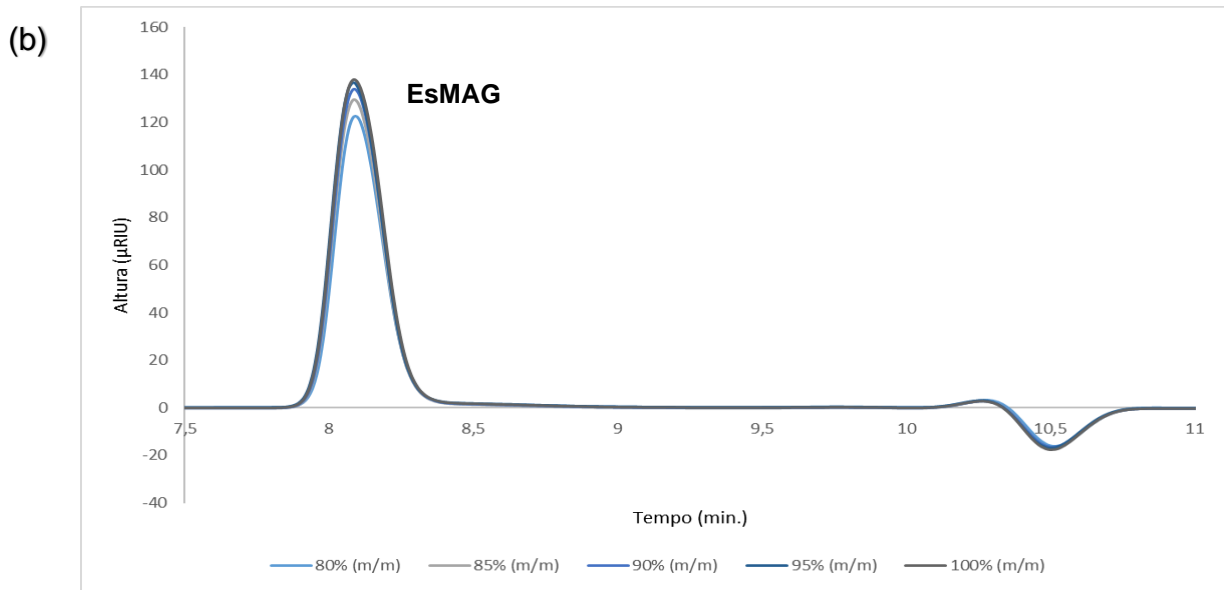


Figura 18. (a) Curva analítica de oleato de metila com concentrações de 79,7%, 85,4%, 88,9%, 94,8% e 100% (m/m), validada no presente trabalho; **(b)** Cromatogramas, obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho, referente à curva analítica de oleato de metila validada no presente trabalho, onde: EsMAG são os ésteres metílicos de ácidos graxos.

O teste de Grubb's foi empregado para verificar a existência de valores aberrantes (*outliers*) nas replicatas da curva analítica da **Figura 18.a**. Como os valores de G calculado para todas as replicatas das concentrações da curva de oleato de metila (**Apêndice B – Tabela 2**) foram inferiores ao valor de G tabelado (1,155) (**Anexo A**), conclui-se que os valores suspeitos não são considerados aberrantes.

O teste de Cochran (Teste C) foi utilizado para verificar a homocedasticidade da curva analítica da **Figura 18.a**. O valor de C calculado para a curva foi de 0,503 (**Apêndice C – Tabela 2**), valor inferior ao de C tabelado (0,684) (**Anexo B**), portanto, a curva analítica foi considerada homocedástica, com 95% de confiança, o que permite o uso do método dos mínimos quadrados para a confecção da curva analítica e a obtenção dos coeficientes do modelo (linear, angular e de determinação, R^2), conforme mostrado na **Tabela 6**.

Tabela 6. Parâmetros de validação para a quantificação de EsMAG por cromatografia de exclusão por tamanho do presente trabalho, da curva teste de oleato de metila do primeiro ensaio e da metodologia desenvolvida por Costa (2022), respectivamente.

Parâmetros	EsMAG (BIOETANOL) ²	EsMAG (LABCOM) ³	EsMAG (COSTA, 2022)
Faixa linear (% mássica) (n=5)	79 – 100	74 - 100	60 - 100
Equação de Regressão	$y = 0,2091x + 7,5702$	$y = 0,65x + 11,645$	$y = 0,8045x + 10,25$
Coeficiente de determinação (R ²)	R ² = 0,9199	R ² = 0,9587	R ² = 0,9985
LD (% mássica)	0,241	1,306	0,256
LQ (% mássica)	0,730	3,959	0,775
Precisão (DPR%) ¹	C1	0,092	0,128
	C3	0,377	0,076
	C5	0,226	0,035
Recuperação (R%) ¹	C1	96,910	98,933
	C3	103,201	96,736
	C5	97,671	99,389

¹ Os valores de repetibilidade e recuperação foram determinados em três concentrações diferentes (menor - C1, média - C3 e maior - C5), em triplicata, para a curva analítica; ² A curva analítica de oleato de metila validada neste atual trabalho foi analisado no laboratório Bioetanol (IQ/UFRJ); ³ A primeira curva teste foi analisada no laboratório LABCOM (EQ/UFRJ); EsMAG – Ésteres metílicos de ácidos graxos; DPR – Desvio padrão relativo; LD – Limite de Detecção; LQ – Limite de Quantificação.

Os resultados apresentados na **Tabela 6** mostram que o valor do coeficiente de determinação (R^2) (**Figura 18.a**) é superior a 0,90 ($R^2 = 0,92$). Isso indica uma boa linearidade, pois quanto mais próximo de 1,0, maior a probabilidade de uma relação linear, resultando em menor dispersão dos pontos experimentais e menor incerteza nos coeficientes de regressão (INMETRO, 2020; SKOOG *et al*, 2013).

Os resultados dos limites de detecção e quantificação encontrados para EsMAG, pelo método proposto, possuem um nível de concentração significativamente menores do que o limite mínimo (96,5% mássica), descrito na legislação vigente. O limite de detecção foi 400 vezes inferior ao limite mínimo, enquanto o limite de quantificação foi 130 vezes menor. Limites de detecção e quantificação significativamente menores que o limite mínimo indicam que o método proposto é altamente sensível, capaz de detectar e quantificar EsMAG em concentrações muito baixas, garantindo precisão e confiabilidade nas análises.

Os limites de quantificação para o método proposto possuem valores compatíveis com os descritos na norma EN 14103 e ASTM D6584. Não existem limites de detecção para os teores de EsMAG na norma ASTM D6584, portando não há parâmetros de referência disponíveis para comparação.

A precisão foi determinada, em condições de repetibilidade, por meio do desvio padrão relativo (DPR%), obtido por análises em triplicata de três concentrações diferentes da curva analítica (concentração menor – C1, média – C3 e maior – C5). Observa-se que os valores de DPR variaram entre 0,09% e 0,37% (**Tabela 6**), indicando assim que o método proposto foi validado em relação a este parâmetro, já que valores de DPR inferiores a 5% indicam boa precisão (INMETRO, 2020).

A exatidão do método foi determinada pela recuperação (%), razão entre a concentração experimentalmente obtida e a concentração teórica esperada. Esta determinação foi realizada por meio de análises em triplicata de três diferentes concentrações da curva analítica (concentração menor – C1, média – C3 e maior – C5). Com base nos resultados apresentados na **Tabela 6**, observa-se que os valores de recuperação variaram entre 96,91% e 103,20%, indicando que o método proposto foi validado em relação a este parâmetro. Valores de recuperação entre 80% e 120% são indicativos de boa exatidão (INMETRO, 2020).

Na **Tabela 6**, também estão apresentados os parâmetros de validação do primeiro ensaio da curva analítica de oleato de metila, juntamente com os parâmetros descritos no trabalho de Costa (2022), ambos analisados no Laboratório de Combustíveis e Derivados do Petróleo (LABCOM) da EQ-UFRJ. Observa-se que, apesar da curva analítica deste atual trabalho ter sido analisada em outro laboratório (Laboratório Bioetanol/ IQ-COPPE-UFRJ), os valores de coeficiente de determinação, limite de detecção e quantificação, precisão e recuperação nas três análises foram muito semelhantes. A consistência nos valores sugere que o método é confiável, robusto e reproduzível, independentemente do laboratório onde as análises foram realizadas. O Teste de Grubbs e o Teste de Cochran da curva analítica do primeiro ensaio se encontram no **Apêndice B (Tabela 1) e C (Tabela 1)**, respectivamente.

5.4. Comparação das amostras por cromatografia por exclusão de tamanho (método adaptado no presente trabalho) e por cromatografia gasosa (método de referência)

As amostras de biodiesel comercial A1 a A5 foram analisadas pelo método adaptado no presente trabalho (CET) e pelo método de referência (CG) (**Apêndice D**), e os resultados se encontram na **Tabela 7**.

Tabela 7. Resultados do teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) (% mássica) das amostras de biodiesel comercial por cromatografia de exclusão por tamanho (CET) e por cromatografia gasosa (CG).

Teor de EsMAG (% m/m)			
Amostra	CET ¹	CG ²	Constituição em oleaginosas
A1	87,4 ± 0,6	90,9 ± 0,5	100% óleo de girassol
A2	91,7 ± 0,1	90,9 ± 0,5	55% óleo de soja, 10% sebo bovino, 10% sebo suíno e 25% óleo de fritura
A3	86,82 ± 0,1	99,31 ± 0,5	100% óleo de soja
A4	78,68 ± 0,1	99,56 ± 0,5	100% óleo de soja
A5	87,89 ± 0,6	98,73 ± 0,5	100% óleo de soja

¹Incerteza padrão tipo A estimada por meio do desvio padrão de três determinações em condições de repetibilidade. ²Incerteza expandida calculada pelo Laboratório de Tecnologias Verdes - GREENTEC/UFRJ.

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 7**, observa-se que os teores de EsMAG (% mássica) das amostras A1 e A2, obtidos por CET, apresentam resultados semelhantes aos resultados obtidos pelo método de referência (CG), porém as amostras A3, A4 e A5 apresentaram valores discrepantes.

As amostras A3, A4 e A5 são constituídas de óleo de soja e apresentam composições bem parecidas em relação aos ésteres encontrados por CG (**Apêndice D**). Seus ésteres majoritários são o estearato de etila e oleato de etila, e as amostras apresentaram composição (%área): A3: 53,8% estearato de etila e 24,9% oleato de etila; A4: 55,0% estearato de etila e 24,8% oleato de etila; e A5: 53,1% estearato de etila e 26,1% oleato de etila. A amostra A1 é constituída de óleo de girassol e tem composição semelhante ao óleo de soja, e apresentou a proporção de 52,5% estearato de etila e 27,1% oleato de etila. Já a amostra A2 tem sebo bovino e suíno em sua constituição, então apresenta maior teor de

ésteres saturados em sua composição, como palmitato de etila e estearato de etila. Sua composição apresentou, em % área, 19,9% palmitato de etila, 35,0% estearato de etila e 32,5% oleato de etila.

Devido a problemas operacionais, as amostras foram enviadas para análise em laboratórios parceiros, sendo analisadas por CET no Laboratório Bioetanol/IQ-COPPE-UFRJ e por CG no laboratório GREENTEC/EQ-UFRJ, com um intervalo de quatro meses entre as análises. Devido a este intervalo, as análises não foram realizadas concomitantemente, resultando, possivelmente, na discrepância entre os resultados. Essa diferença de tempo considerável, combinada com o uso de diferentes equipamentos e analistas, impediu que obtivéssemos os resultados esperados. Acredita-se que uma análise concomitante, realizada sob as mesmas condições, apresentaria resultados mais consistentes.

Apesar da discrepância entre os resultados, o método proposto (CET) demonstra um potencial para substituir o método de referência, uma vez que apresenta algumas vantagens, tais como:

- 1) Cromatograma mais simples, apresentando apenas um único pico de EsMAG, sendo assim, mais fácil de integrar e quantificar e;
- 2) Redução do tempo de análise (de 30 min para 15 min).

6. CONCLUSÃO

O método de COSTA, 2022, adaptado no presente trabalho apresentou boa linearidade (coeficientes de determinação $\geq 0,90$). Os limites de detecção e quantificação da curva analítica foram de 0,241 e 0,730, respectivamente. Os valores de precisão, determinados por meio da recuperação, variaram de 96,91% a 103,20%, indicando assim que o método adaptado foi validado em relação a este parâmetro, já que valores de recuperação na faixa de 80% e 120% indicam boa exatidão. Os valores de desvio padrão relativo variaram entre 0,09% e 0,37%, indicando assim que o método adaptado foi validado

em relação a este parâmetro, já que valores de desvio padrão relativo inferiores a 5% indicam boa precisão.

Devido ao fato das análises por cromatografia de exclusão por tamanho e pela metodologia de referência (CG) não terem sido realizadas concomitantemente, houve uma discrepância entre os resultados. Acredita-se que a redução do intervalo entre as análises, realizadas sob as mesmas condições, proporcionaria resultados mais consistentes.

O método adaptado para análise de ésteres metílicos de ácidos graxos em biodiesel, por cromatografia de exclusão por tamanho, apresenta algumas vantagens em relação aos métodos de GC de referência, pois obtém o conteúdo de cada classe analisada, independentemente de seus componentes, o que facilita a integração das áreas de seus respectivos picos. Além disso, a análise é bem mais rápida (15 min.) do que o método de referência (30 min.).

7. PROPOSTAS FUTURAS

Ao final deste trabalho, tornou-se evidente a necessidade de análises adicionais para resolver alguns questionamentos relacionados a este campo de estudo, tais como:

- 1) Realizar as análises pelo método adaptado no presente trabalho e de referência de forma concomitante;
- 2) Analisar um número maior de amostras pelos métodos (adaptado e de referência) e;
- 3) Empregar o método proposto por COSTA, 2022, para a determinação de glicerina combinada (somatório de mono- di- e triacilgliceróis) em amostras de biodiesel comercial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis – ANP. **Biocombustíveis - Biodiesel**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>. Consultado em 04 de setembro de 2023.

Agência Nacional de Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis – ANP. **Resolução ANP N° 45, DE 26 DE AGOSTO DE 2014**. Disponível em <http://www.anp.gov.br>. Consultado em: 04 de setembro de 2023.

Agência Nacional de Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis – ANP. **Resolução ANP N° 920, DE 04 DE ABRIL DE 2023**. Disponível em <http://www.anp.gov.br>. Consultado em: 04 de setembro de 2023.

Agência de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf. Consultado em: 8 de outubro de 2023.

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, n. 6, 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.

AQUINO NETO, F.R.; SOUZA NUNES, D.S. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins**. Editora Interciência; Rio de Janeiro, 1 ed^a., 2003.

ARZAMENDI, G.; ARGUIÑARENA, E.; CAMPO, I.; GANDÍA, L M. **Monitoring of biodiesel production: Simultaneous analysis of the transesterification products using size-exclusion chromatography**. Chemical Engineering Journal, v. 122, p 31-40, 2006.

Associação dos Produtores de Soja e Milho de Mato Grosso – APROSOJA. **Soja no Brasil**. Disponível em: <http://www.aprosojams.org.br/soja>. Consultado em: 10 de janeiro de 2024.

Associação dos Produtores de Biocombustíveis do Brasil – APROBIO. **Matérias-primas no Brasil**. Disponível em: <https://aprobio.com.br/noticia/materias-primas-para-o-biodiesel>. Consultado em: 10 de janeiro de 2024.

BEZERRA, J.K.A. **Avaliação Do Equilíbrio De Fases De Misturas Biodiesel E Álcoois De Cadeia Curta Com Aplicação Em Motores Ciclo Diesel**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2023.

BIODIESELBR, **Especificações do Biodiesel**. Disponível em: <https://www.biodieselbr.com/biodiesel/especificacoes/especificacao-biodiesel.htm#>. Consultado em: 21 de janeiro de 2024.

BIODIESELBR, **Efeito do biodiesel em relação às emissões de poluentes controlados**. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/efeitoestufa/gases/emissoes.htm>. Consultado em: 21 de janeiro de 2024.

BLATT, G. G. **Utilização da Cromatografia em Coluna e da Cromatografia de Alta Eficiência na Separação, Isolamento e Identificação das Principais Classes Constituintes do Biodiesel**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química, 2014.

BORGES, M.E.; DIAZ, L. **Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.16, p.2839–2849, 2012.

COSTA, A.O. **A Inserção do Biodiesel na Matriz Energética Nacional: Aspectos Socioeconômicos, Ambientais e Institucionais**. Tese de Doutorado, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

COSTA, R.P.M. **Análise Simultânea De Mono-, Di-, Triacilgliceróis E Ésteres Metílicos De Ácidos Graxos No Biodiesel Por Cromatografia De Exclusão Por Tamanho**. Tese de Doutorado, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2022.

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., Escola de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

COSTA, R.P.M.; SOUZA, C.G.; SANTOS, R.C.; ANDRADE, D.F.; D'AVILA, L.A. **Simultaneous Analysis of Mono-, Di, Triacylglycerols, and Fatty Acid Methyl Esters in Biodiesel by Size-Exclusion Chromatography**". *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.123, p. 1-7, 2021.

DARNOKO, D.; CHERYAN, M.; PERKINS, E.G. **Analysis of vegetable oil transesterification products by gel permeation chromatography**. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v.23, p.2327-2335, 2000.

DABDOUB, M.J.; BRONZEL, J.L.; RAMPIN M.A. **Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria**. *Química Nova*, v.32, p.776-792, 2009.

DIAS, A.N.; CERQUEIRA, M.B.R.; MOURA, R.R.M.; KURZ, M.H.S.; CLEMENTIN, R.M.; D'OCA, M.G.M.; PRIMEL, E.G. **Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography**. *Fuel*, v.94, p.178–183, 2012.

EMBRAPA. **Agroenergia: Biodiesel.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agroenergia/biodiesel#:~:text=As%20principais%20mat%C3%A9rias%2Dprimas%20para,residuais%20e%20de%20gorduras%20animais>. Consultado em: 02 de fevereiro de 2024.

EMBRAPA. **Agroenergia: Políticas e Legislação.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agroenergia/socioeconomia/biodiesel/politicas-e-legislacao#:~:text=O%20Programa%20Nacional%20de%20Produ%C3%A7%C3%A3o,substituir%20parcial%20ou%20totalmente%20combust%C3%ADveis>. Consultado em: 02 de fevereiro de 2024.

FARIA, F.D. et al. **Determination of Ester content in different kinds of biodiesel.** *Journal o ASTM International*, v.7, p.1-8, 2010.

FOSCHIERA, I.P. **O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel: Impactos e Perspectivas.** Monografia, Curso de Ciências Sociais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GARCIA, C.M. **Transesterificação de óleos vegetais.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GASPARINI, F. **Avaliação e Adaptação das Condições da EN 14103 para Quantificação de Ésteres em Biodieseis Etílicos puros de Soja, Babaçu, Palma e Sebo Bovino e em suas Misturas.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

GERPEN, J.H.V.; PETERSON, C.L.; GOERING, C.E. **Biodiesel: An Alternative Fuel for Compression Ignition Engines.** *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, n.31, p.1-22, 2007.

GUTIÉRREZ-OPPE, E.E. **Gestão da Qualidade do biodiesel no Brasil comparada com modelos internacionais.** *GEPROS-Gestão da Produção, Operações e Sistemas*, Bauru, n.2, p. 131-149, 2013.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos.** DOQ-CGCRE-008, 9ª revisão, 2020.

INMETRO. **Workshop de Laboratórios de Alimentação Animal.** Disponível em: <https://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2017/12/11-Validacao-de-Metodos-Eliane-Rego.pdf>. Consultado em: 10 de fevereiro de 2024.

KITTIRATTANAPIBOON, K.; KRISNANGKURA, K.; **Separation of Acylglycerols, FAME, and FFA in biodiesel by size exclusion chromatography.** *Eur.J.Lip Sci.Tecnology*, v 110, p 422-427, 2008.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de biodiesel**. Editora EDAGard Blücher; São Paulo, 1. ed., 2006.

KOAKUZU, S.N.; BASSINELLO, P.Z., CARVALHO, R.N. **Procedimento para determinação do teor de amilose em arroz por Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC)**. Comunicado técnico 226, ISSN 1678-961X, Santo Antônio de Goiás, Goiás, 2015.

LEUNG, D.Y.C.; WU, X.; LEUNG, M.K.H.; **A review on biodiesel production using catalyzed transesterification**. Applied Energy, v.87, Issue 4, p.1083–1095, 2010.

LEUNG, D.Y.C.; GUO Y.; **Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production**, Fuel Process Technol, v.87, p.883–890, 2006.

LIMA, J. R. O.; SILVA, R. B.; SILVA, C. C. M.; SANTOS, L. S. S.; SANTOS JR., J. R.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R.; **Biodiesel de Babaçu (Orbignya sp.) Obtido por Via Etanólica**. Química Nova, v.30, p.600-603, 2007.

LÔBO, I.P.; FERREIRA, S.L.C.; CRUZ, R.S. **Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos**. Química Nova, v.32, p.1596-1608, 2009.

MADRAS, G.; KOLLURU, C.; KUMAR, R. **Synthesis of biodiesel in supercritical fluids**. Fuel, v.83, p.2029-2033, 2004.

MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; BRITO, Y. C. **A Reação de Transesterificação, Algumas Aplicações e Obtenção de Biodiesel**. Revista Virtual Química, v.5, N.1, p.63-73, 2013.

MIRANDA, J.L., MOURA, L.C. **BOA - Biodiesel: Obtenção e Análise de qualidade**. Publit, 7ª edição, capítulo 5, 2016.

MOJSIEWICZ-PIEŃKOWSKA, K. **Size Exclusion Chromatography a Useful Technique For Speciation Analysis of Polydimethylsiloxanes**. Green Chromatographic Techniques, cap. 9, p.181-202, 2014.

MUNIZ, R. O. **Análise de acilgliceróis e determinação do teor de glicerol total em amostras de biodiesel por métodos enzimáticos e não cromatográficos, após separação e isolamento das principais classes constituintes por extração em fase sólida**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

NAKAGAKI, S.; BAIL, A.; SANTOS, V. C.; SOUZA, V.H.R.; VRUBEL, H.; NUNES, F. S.; RAMOS, L.P; **Use of Anhydrous sodium molybdate as an efficient heterogeneous catalyst for soybean oil methanolysis**. Applied Catalysis A: General, V 351, p.267-274, 2008.

PACHECO, F. **Energias Renováveis: breves conceitos.** Conjuntura e Planejamento, n.149, p.4-11, 2006.

PELISSON, L. **Análise Direta de Mono, Di e Triacilglicerídeos em Biodiesel por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução: Resolução ANP 42 e Suas Extensões.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2008.

PINTO, M.S.L. **A Viabilidade do Uso de Biocombustíveis da Aman.** Monografia final de curso, Academia Militar das Agulhas Negras, Resende, 2018.

PRADOS, C.P.; REZENDE, D.R.; BATISTA, R.L.; ALVES, M.I.R.; FILHO, N.R.A.; **Simultaneous gas chromatographic analysis of total esters, mono-, di- and triacylglycerides and free and total glycerol in methyl or ethyl biodiesel.**

QUADROS, D. P, C.; CHAVES, E. S.; SILVA, J. S. A.; TEIXEIRA, L. S. G.; CURTIUS, A. J.; PEREIRA, P. A. P. **Contaminantes em Biodiesel e Controle de Qualidade.** Revista Virtual de Química, v.3, p.376-384, 2011.

RAMOS, L. P; KOTHE, V.; CÉSAR-OLIVEIRA. M. A. F.; MUNIZ-WYPYCH, A. S.; NAKAGAKI, S.; KRIEGER, N.; WYPYCH, F.; CORDEIRO, C. S. **Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis.** Revista Virtual de Química, v.9, p.317-369, 2017.

RIBEIRO, M.D.; CALERA, G.C.; FLUMIGNAN, D.L. **Determinação e Quantificação do Teor de Ésteres em Biodiesel Provenientes de Matérias-Primas de Baixa Qualidade por Cromatografia Gasosa.** Revista Brasileira de Energias Renováveis, v.6, n.1, p.29-38, 2017.

RINALDI, R., GARCIA, C., MARCINIUK, L.L., ROSSI, V., SCHUCHARDT, U. **Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral.** Química Nova, v.30, p. 1374-1380, 2007.

SANTOS, B.L; SILVA, K.K; SANTOS, A.P.F, ANDRADE, D.F; d'AVILA, L.A. **Simultaneous Analysis of Esters and Acylglycerols in Biodiesel by High-Performance Liquid Chromatography With Refractive Index Detection.** Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 39, issue 13, p. 620-626, 2016.

SANTOS, V.F. **Biodiesel: O Combustível Ecológico.** Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense, v.2, n. 1, p. 215-219, 2012.

SCHOENFELDER, W.; **Determination of monoglycerides, diglycerides, triglycerides and glycerol in fats by means of gel permeation chromatography.** Eur. J. Lipid Sci. Technol. v.105, p.45-4, 2003.

SILVA, F.L; **Validação de metodologia analítica empregando coluna curta em cromatografia gasosa para determinação de ésteres alquílicos.** Dissertação de M.Sc., Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2016.

SILVA, G.C.R. **Predição de propriedades, Modelagem e Simulação de processos de conversão de óleos vegetais em biocombustíveis por rota convencional e desoxigenação.** Tese de Doutorado, Escola de engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

SOUZA, C.G; ARAÚJO, M.T.; SANTOS, R.C.; ANDRADE, D.F.; SILVA, B.V; d'AVILA, L.A.; **Analysis and Quantitation of Fatty Acid Methyl Esters in Biodiesel by High-Performance Liquid Chromatography.** Energy & Fuels, v. 32, issue 11, p. 11547-11554, 2018.

SYED, M.B. **Analysis of biodiesel by high performance liquid chromatography using refractive index detector.** MethodsX, v.4, p.256–259, 2017.

WU, Chi-San. **Handbook of size exclusion chromatography and related techniques: revised and expanded.** CRC press, 2003.

APÊNDICE A – Preparo das soluções padrão para curva analítica de linolenato de metila e oleato de metila.

Tabela 1. Preparo das soluções padrão para curva analítica de linolenato de metila, seguindo a norma NBR 15764.

Curva Analítica - Linolenato de Metila (NBR 15764)						
Nível	Concentração Teórica % (m/m)	Massa Teórica (g)	Massa Total Teórica (Analito + Solvente) (g)	Massa do Analito (g)	Massa Total (Analito + Solvente) (g)	Concentração do Analito % (m/m)
1	1%	0,0010	26,8010	0,0010	26,8043	0,0037
2	5%	0,0050	26,8050	0,0048	26,8135	0,0179
3	10%	0,0100	26,8100	0,0099	26,8345	0,0369
4	40%	0,0400	26,8400	0,0400	26,8877	0,1488
5	90%	0,0900	26,8900	0,0899	26,8945	0,3343
6	99%	0,0990	26,8990	0,0995	26,9036	0,3698

Tabela 2. Preparo das soluções padrão para curva analítica de oleato de metila do primeiro ensaio.

Curva Analítica - Oleato de Metila (Primeiro Ensaio)						
Nível	Concentração Teórica % (m/m)	Massa Teórica (g)	Massa Total Teórica (Analito + Solvente) (g)	Massa do Analito (g)	Massa Total (Analito + Solvente) (g)	Concentração do Analito % (m/m)
1	80%	0,2000	0,2500	0,20009	0,26830	74,5770
2	85%	0,2125	0,2500	0,21611	0,24963	86,5721
3	90%	0,2225	0,2500	0,22462	0,24940	90,0642
4	95%	0,2375	0,2500	0,23901	0,25534	93,6046
5	100%	0,2500	-	0,25266	-	100,0000

Tabela 3. Preparo das soluções padrão para curva analítica de oleato de metila validada no presente trabalho.

Curva Analítica - Oleato de Metila						
Nível	Concentração Teórica % (m/m)	Massa Teórica (g)	Massa Total Teórica (Analito + Solvente) (g)	Massa do Analito (g)	Massa Total (Analito + Solvente) (g)	Concentração do Analito % (m/m)
1	80%	0,2000	0,2500	0,19935	0,25004	79,7272
2	85%	0,2125	0,2500	0,21311	0,24956	85,3943
3	90%	0,2225	0,2500	0,22340	0,25134	88,8836
4	95%	0,2375	0,2500	0,23849	0,25160	94,7893
5	100%	0,2500	-	0,25038	-	100,0000

APÊNDICE B – Teste de Grubb's das concentrações das curvas analíticas de EsMAG.

Tabela 1. Teste de Grubb's das concentrações da curva analítica de oleato de metila do primeiro ensaio.

CURVA ANALÍTICA						G tabelado 95%
Concentração	Área	Média das Áreas	Desvio-padrão	Variância	G calculado	1,155
74,5770	60,8581	60,7326	0,257329069	0,06621825	0,487702381	Ok
74,5770	60,4366				1,150278127	Ok
74,5770	60,9031				0,662575745	Ok
86,5721	68,3939	68,4345	0,064968172	0,004220863	0,624408316	Ok
86,5721	68,4001				0,528976971	Ok
86,5721	68,5094				1,153385287	Ok
90,0642	68,1651	68,2759	0,168385698	0,028353743	0,658211087	Ok
90,0642	68,1930				0,492520055	Ok
90,0642	68,4697				1,150731142	Ok
93,6046	71,7731	71,9205	0,152649151	0,023301763	0,965394603	Ok
93,6046	72,0779				1,031341034	Ok
93,6046	71,9104				0,065946431	Ok
100,0000	77,9143	77,9843	0,063294866	0,00400624	1,105934888	Ok
100,0000	78,0011				0,265424373	Ok
100,0000	78,0375				0,840510515	Ok
Soma				0,12610086		

Tabela 2. Teste de Grubb's das concentrações da curva analítica de oleato de metila validada neste trabalho.

CURVA ANALÍTICA						G tabelado 95%
Concentração	Área	Média das Áreas	Desvio-padrão	Variância	G calculado	1,155
79,72724364	23,7162	23,7260	0,015274816	0,00023332	0,641578928	Ok
79,72724364	23,7436				1,152223382	Ok
79,72724364	23,7182				0,510644453	Ok
85,39429396	25,6097	25,6170	0,024343035	0,000592583	0,30124976	Ok
85,39429396	25,5972				0,814743669	Ok
85,39429396	25,6442				1,11599343	Ok
88,88358399	26,7785	26,7508	0,070140312	0,004919663	0,395397919	Ok
88,88358399	26,6710				1,137244256	Ok
88,88358399	26,8028				0,741846337	Ok
94,78934817	27,5776	27,6258	0,042413009	0,001798863	1,137229696	Ok
94,78934817	27,6426				0,395318961	Ok
94,78934817	27,6573				0,741910734	Ok
100	27,9392	27,9933	0,047228275	0,00223051	1,145500222	Ok
100	28,0263				0,698733962	Ok
100	28,0144				0,44676626	Ok
Soma				0,00977494		

APÊNDICE C – Teste de Cochran das curvas analíticas de EsMAG.

Tabela 1. Teste de Cochran da curva analítica de oleato de metila do primeiro ensaio.

Cochran			
Máxima Variância	C Calculado	Concentração	Valor Crítico (0,684)
0,06621825	0,52512132	74,58	Homocedástico
		86,57	Homocedástico
		90,06	Homocedástico
		93,6	Homocedástico
		100	Homocedástico

Tabela 2. Teste de Cochran da curva analítica de oleato de metila validada neste trabalho.

Teste de Cochran			
Máxima Variância	C Calculado	Concentração	Valor Crítico (0,684)
0,004919663	0,503293456	79,72	Homocedástico
		85,39	Homocedástico
		88,88	Homocedástico
		94,78	Homocedástico
		100	Homocedástico

APÊNDICE D – Análise das amostras de biodiesel comercial por cromatografia gasosa (CG)

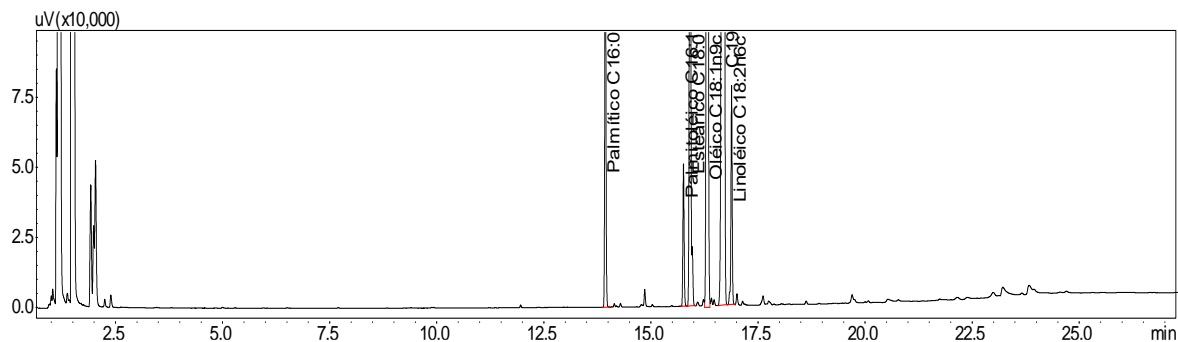


Figura 1. Cromatograma, obtido por CG, da amostra de biodiesel comercial A1

Tabela 1. Resultados, obtidos por CG, da amostra de biodiesel comercial A1

Tempo		Area%
13.937	Palmítico C16:0	10.8027
15.760	Palmitoléico C16:1	3.7080
15.917	Estearíco C18:0	27.1232
16.322	Oléico C18:1n9c	52.5022
16.883	Linoléico C18:2n6c	5.8639

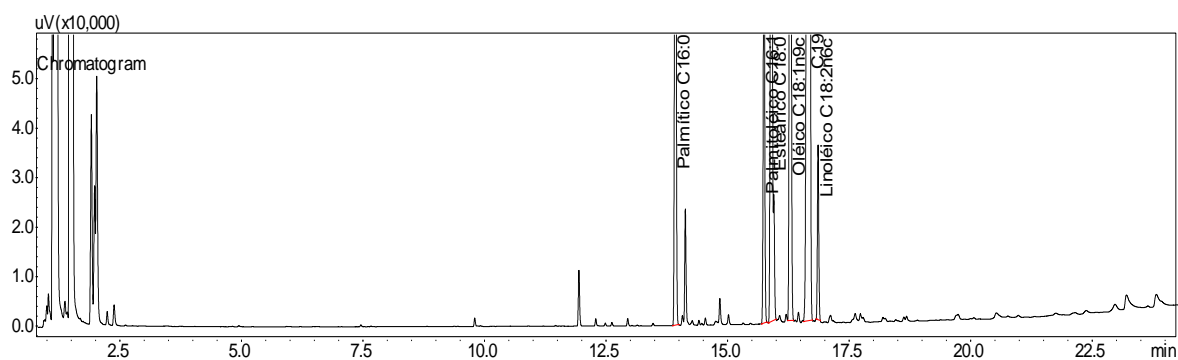
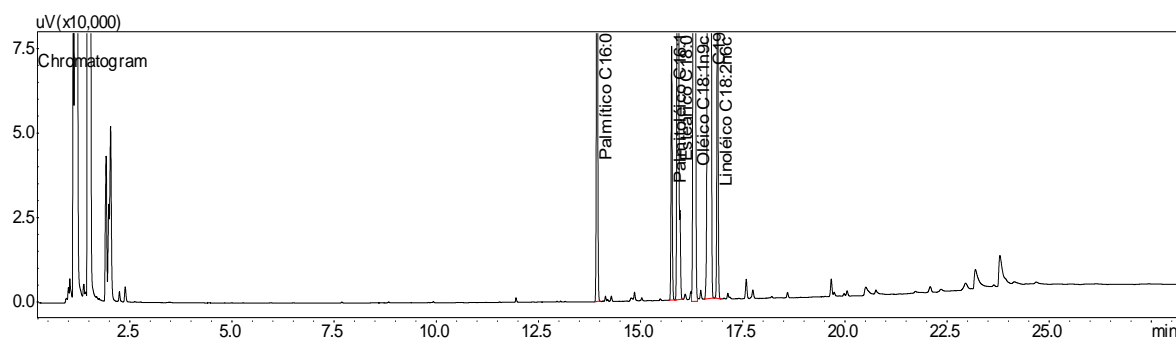


Figura 2. Cromatograma, obtido por CG, da amostra de biodiesel comercial A2

Tabela 2. Resultados, obtidos por CG, da amostra de biodiesel comercial A2

Tempo		Area%
13.927	Palmítico C16:0	19.8552
15.748	Palmitoléico C16:1	9.4492
15.903	Esteárico C18:0	35.0738
16.293	Oléico C18:1n9c	32.5108
16.860	Linoléico C18:2n6c	3.1110

**Figura 3.** Cromatograma, obtido por CG, da amostra de biodiesel comercial A3**Tabela 3.** Resultados, obtidos por CG, da amostra de biodiesel comercial A3

Tempo		Area%
13.935	Palmítico C16:0	10.5224
15.760	Palmitoléico C16:1	4.2479
15.916	Esteárico C18:0	24.9605
16.326	Oléico C18:1n9c	53.8260
16.882	Linoléico C18:2n6c	6.4432

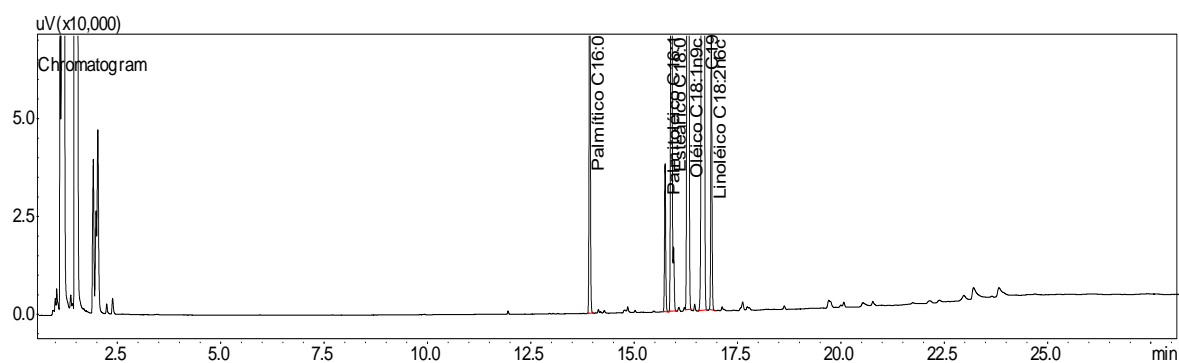
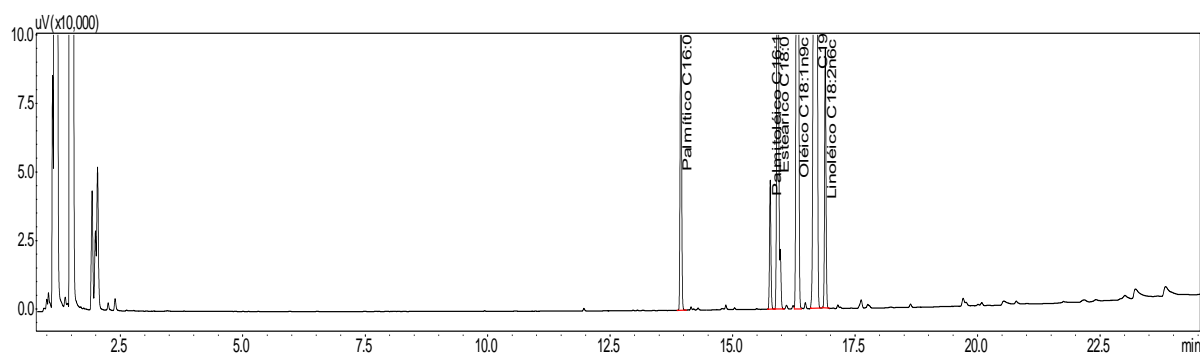
**Figura 4.** Cromatograma, obtido por CG, da amostra de biodiesel comercial A4

Tabela 4. Resultados, obtidos por CG, da amostra de biodiesel comercial A4

Tempo		Area%
13.926	Palmítico C16:0	10.6166
15.748	Palmitoléico C16:1	3.3029
15.902	Estearíco C18:0	24.8123
16.308	Oléico C18:1n9c	55.0157
16.867	Linoléico C18:2n6c	6.2525

**Figura 5.** Cromatograma, obtido por CG, da amostra de biodiesel comercial A5**Tabela 5.** Resultados, obtidos por CG, da amostra de biodiesel comercial A5

Tempo		Area%
13.944	Palmítico C16:0	10.6108
15.767	Palmitoléico C16:1	3.3526
15.923	Estearíco C18:0	26.0728
16.331	Oléico C18:1n9c	53.1539
16.891	Linoléico C18:2n6c	6.8099

ANEXO A – TABELA TESTE DE GRUBB'S

Tabela 1. Tabela com valores críticos para o teste de Grubb's (ASTM E178-00)

Number of Observations n	Values of Grubbs Statistic (G)					
	Confidence Level (%)					
	99.9	99.5	99	97.5	95	90
3	1.155	1.155	1.155	1.155	1.153	1.148
4	1.499	1.496	1.492	1.481	1.463	1.425
5	1.780	1.764	1.749	1.715	1.672	1.602
6	2.011	1.973	1.944	1.887	1.822	1.729
7	2.201	2.139	2.097	2.020	1.938	1.828
8	2.358	2.274	2.221	2.126	2.032	1.909
9	2.492	2.387	2.323	2.215	2.110	1.977
10	2.606	2.482	2.410	2.290	2.176	2.036
11	2.705	2.564	2.485	2.355	2.234	2.088
12	2.791	2.636	2.550	2.412	2.285	2.134
13	2.867	2.699	2.607	2.462	2.331	2.175
14	2.935	2.755	2.659	2.507	2.371	2.213
15	2.997	2.806	2.705	2.549	2.409	2.247
16	3.052	2.852	2.747	2.585	2.443	2.279
17	3.103	2.894	2.785	2.620	2.475	2.309
18	3.149	2.932	2.821	2.651	2.504	2.335
19	3.191	2.968	2.854	2.681	2.532	2.361
20	3.230	3.001	2.884	2.709	2.557	2.385
30	3.507	3.236	3.103	2.908	2.745	2.563
40	3.673	3.381	3.240	3.036	2.866	2.682
50	3.789	3.483	3.336	3.128	2.956	2.768
60	3.874	3.560	3.411	3.199	3.025	2.837
70	3.942	3.622	3.471	3.257	3.082	2.893
80	3.998	3.673	3.521	3.305	3.130	2.940
90	4.044	3.716	3.563	3.347	3.171	2.981
100	4.084	3.754	3.600	3.383	3.207	3.017

Source: ASTM E178-00, "Standard Practice for Dealing with Outlying Observations"

ANEXO B – TABELA TESTE DE COCHRAN

Tabela 1. Valores de C tabelado para teste de Cochran, a nível de 95% de confiança (MASSART *et al.*, 1997).

Tabela com os valores críticos de Cochran ($\alpha=0,05$)

l	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7	n=8	n=9	n=10	n=11
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8872	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884
5	0,8412	0,6838	0,5981	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4184	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3259	0,3154
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3007	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568
10	0,6020	0,4450	0,3733	0,331	0,3029	0,2828	0,2666	0,2541	0,2439	0,2353
11	0,0570	0,4170	0,3480	0,3080	0,2810	0,2626	0,2466	0,2355	0,2249	0,2183
12	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020
13	0,5150	0,3710	0,3070	0,2710	0,2430	0,2297	0,2160	0,2054	0,1978	0,1862
14	0,4920	0,3520	0,2910	0,2550	0,2320	0,2152	0,2034	0,1934	0,1860	0,1752
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671
16	0,4520	0,3190	0,2620	0,2300	0,2080	0,1926	0,1809	0,1717	0,1641	0,1590
17	0,4340	0,3050	0,2500	0,2190	0,1980	0,1829	0,1716	0,1628	0,1556	0,1510
18	0,4180	0,2930	0,2400	0,2090	0,1890	0,1753	0,1645	0,1560	0,1490	0,1430
19	0,4030	0,2810	0,2300	0,2000	0,1810	0,1684	0,1579	0,1497	0,1429	0,1360
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303
21	0,3770	0,2610	0,2120	0,1850	0,1670	0,1526	0,1429	0,1353	0,1324	0,1253
22	0,3650	0,2520	0,2040	0,1780	0,1600	0,1469	0,1376	0,1302	0,1275	0,1193
23	0,3540	0,2430	0,1970	0,1720	0,1550	0,1431	0,1340	0,1268	0,1209	0,1143
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1286	0,1216	0,1160	0,1113
25	0,3340	0,2280	0,1850	0,1600	0,1440	0,1327	0,1241	0,1173	0,1116	0,1078
26	0,3250	0,2210	0,1790	0,1550	0,1400	0,1283	0,1200	0,1134	0,1075	0,1044
27	0,3160	0,2150	0,1730	0,1500	0,1350	0,1244	0,1162	0,1098	0,1038	0,1011
28	0,3080	0,2090	0,1680	0,1460	0,1310	0,1208	0,1129	0,1066	0,1006	0,0979
29	0,3000	0,2030	0,1640	0,1420	0,1270	0,1175	0,1097	0,1036	0,0975	0,0948
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921
31	0,2830	0,1930	0,1550	0,1340	0,1200	0,1099	0,1034	0,0975	0,0932	0,0895
32	0,2800	0,1880	0,1510	0,1310	0,1170	0,1073	0,1009	0,0952	0,0911	0,0865
33	0,2730	0,1840	0,1470	0,1270	0,1140	0,1047	0,0985	0,0928	0,0889	0,0839
34	0,2670	0,1790	0,1440	0,1240	0,1110	0,1021	0,0960	0,0905	0,0868	0,0814
35	0,2620	0,1750	0,1400	0,1210	0,1080	0,0995	0,0936	0,0882	0,0847	0,0791
36	0,2560	0,1720	0,1370	0,1180	0,1060	0,0969	0,0912	0,0859	0,0826	0,0770
37	0,2510	0,1680	0,1340	0,1160	0,1030	0,0943	0,0887	0,0836	0,0804	0,0751
38	0,2460	0,1640	0,1310	0,1130	0,1010	0,0917	0,0863	0,0812	0,0783	0,0735
39	0,2420	0,1610	0,1290	0,1110	0,0990	0,0891	0,0838	0,0789	0,0762	0,0721
40	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713
41	0,2338	0,1554	0,1241	0,1066	0,0954	0,0874	0,0815	0,0769	0,0734	0,0702
42	0,2307	0,1532	0,1223	0,1050	0,0939	0,0861	0,0803	0,0757	0,0723	0,0691
43	0,2275	0,1509	0,1204	0,1034	0,0925	0,0847	0,0790	0,0746	0,0711	0,0681
44	0,2243	0,1487	0,1186	0,1019	0,0911	0,0834	0,0778	0,0734	0,0700	0,0670
45	0,2212	0,1465	0,1168	0,1003	0,0897	0,0821	0,0766	0,0723	0,0689	0,0659
46	0,2180	0,1443	0,1150	0,0987	0,0882	0,0808	0,0754	0,0712	0,0678	0,0648
47	0,2148	0,1420	0,1132	0,0971	0,0868	0,0795	0,0742	0,0700	0,0666	0,0637
48	0,2117	0,1398	0,1113	0,0955	0,0854	0,0781	0,0729	0,0689	0,0655	0,0627
49	0,2085	0,1376	0,1095	0,0939	0,0839	0,0768	0,0717	0,0677	0,0644	0,0616
50	0,2054	0,1354	0,1077	0,0924	0,0825	0,0755	0,0705	0,0666	0,0633	0,0605

l – Número de soluções padrão, de diferentes concentrações, utilizadas na construção da curva analítica;

n – Número de replicatas realizadas.