

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Conny Cerai Ferreira

**DETERMINAÇÃO DIRETA E SIMULTÂNEA DE SÓDIO, POTÁSSIO E
CÁLCIO EM BIODIESEL POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA EM
CHAMA**

Belo Horizonte

2013

UFMG/ICEx/DQ 946^a

D. 523^a

Conny Cerai Ferreira

**DETERMINAÇÃO DIRETA E SIMULTÂNEA DE SÓDIO, POTÁSSIO E
CÁLCIO EM BIODIESEL POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA EM
CHAMA**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Química do Instituto de
Ciências Exatas da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em
Química- Química Analítica.

Belo Horizonte

2013

F383d Ferreira, Conny Cerai
2013 Determinação direta e simultânea de sódio, potássio
D e cálcio em biodiesel por espectrometria de emissão
 atômica em chama / Conny Cerai Ferreira. 2013.
 xi, 99 f. : il.

 Orientador: Paulo Jorge Sanches Barbeira.
 Coorientadora: Letícia Malta Costa.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.

 Bibliografia: f. 75-85.

 1. Química analítica - Teses 2. Biodiesel - Teses
3. Metais - Teses 4. Espectroscopia de emissão atômica
- Teses 5. Espectroscopia de chama - Teses I.
Barbeira, Paulo Jorge Sanches, Orientador II. Costa,
Letícia Malta, Coorientadora III. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



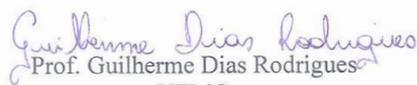
**"Determinação Direta e Simultânea de Sódio, Potássio e Cálcio em Biodiesel por
Espectrometria de Emissão Atômica em Chama"**

Conny Cerai Ferreira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Paulo Jorge Sanches Barbeira - Orientador
UFMG


Profa. Leticia Malta Costa - Coorientadora
UFMG


Prof. Guilherme Dias Rodrigues
UFMG


Prof. Fernando Barboza Egreja Filho
UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

À Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Combustível, FINEP e Ministério de Ciência e Tecnologia, na figura do PRH-46, pelo apoio financeiro.

Aos orientadores Paulo Jorge e Letícia Malta por me tolerarem durante este período.

À Silvinha pela amizade, pela companhia, pelos bons e maus conselhos (hahaha...) e pelas homogeneizações das amostras.

Às companheiras de grupo, Ariane, Cris e Rosi pela amizade e companhia.

À equipe do LEC pela disposição em contribuir com o desenvolvimento do trabalho, em especial Vinícius, Soninha, Alessandra, Raquelzinha e Carlos.

Por último e não menos importante, ao Rafael, por ter sido minha fonte de paciência, pelo amor e por ter me apoiado e acalmado nos momentos de surto pelo *stress*.

Obrigada a todos.

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um procedimento analítico para quantificação de Na, K e Ca em amostras de biodiesel por análise direta através da Espectrometria de Emissão Atômica em Chama (FAES) utilizando um detector de emissão contínua. Foram propostos dois métodos possíveis de calibração, sendo o primeiro a calibração externa e o segundo a calibração externa com o uso de padrão interno para corrigir possíveis efeitos de transporte das soluções. As soluções de calibração foram preparadas pela solubilização de padrões organometálicos em oleato de metila, qual foi utilizado como simulacro da matriz. Interferências químicas e espectrais foram investigadas no desenvolvimento do procedimento, além da realização de um extenso trabalho para otimizar e melhorar as condições de operação do equipamento e do procedimento. O procedimento foi parcialmente validado de acordo com as instruções do Manual de Validação do MAPA, seguindo um rigoroso tratamento estatístico dos dados. Foram desenvolvidas planilhas para tratamento dos dados da curva de calibração pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) e para estimar os limites de detecção e de quantificação através das Curvas de Limite de Previsão. O procedimento apresentou boa linearidade ($R > 0,99$), alta sensibilidade, baixos limites de detecção e quantificação para todos os analitos. Foi observado um pequeno efeito de matriz que pode ser resultado de interferência química devido a presença de outros elementos nos padrão organometálico multielementar utilizado nas curvas de calibração. A veracidade foi verificada pela comparação dos resultados da quantificação dos analitos nas amostras pelo procedimento proposto e pelo procedimento normalizado ABNT NBR 15556 através de testes de hipótese a 95% de confiança mostrando que os resultados obtidos por ambos procedimentos não diferem estatisticamente. A repetitividade mostrou-se adequada e a reprodutibilidade foi prejudicada devido à instabilidade do equipamento.

Palavras-chave: Biodiesel, metais, FAES, análise direta.

ABSTRACT

We have developed an analytical procedure for the quantification of Na, K and Ca in biodiesel samples by direct analysis by Flame Atomic Emission Spectrometry (FAES) using a continuous emission detector. Were shown two possible methods of calibration were available, the first is external calibration and the second external calibration using an internal standard to correct possible effects of transport of solutions. The calibration solutions were prepared by solubilizing organometallic standards in methyl oleate, wich was used as mock matrix. Chemical and spectral interferences were investigated in the development of the procedure. In addition, an extensive work to optimize and improve the operation of the equipment and procedure. The procedure was partially validated according to the instructions of the Validation Manual MAPA, following a rigorous statistical treatment of the data. Spreadsheets were developed for processing the data of the calibration curve by Method of Weighted Least Squares (MWLS) and to estimate the limits of detection and quantification through Prediction Limit Curves. The procedure showed good linearity ($R > 0.99$), high sensitivity, low limits of detection and quantification for all analytes. A small matrix effect was observaed. It may result from chemical interference due to the presence of other elements in organometallic multielement standard used in the calibration curves. The accuracy was assessed by comparing the results of quantitation of analytes in samples and the procedure proposed by the standard procedure ABNT NBR 15556 through hypothesis tests at 95% confidence level, shawed that results obtained by both procedures are statistically equal. The repeatability was adequate and reproducibility was impaired due to the instability of the equipment.

Keywords: Biodiesel, metals, FAES, direct analysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Evolução mensal da capacidade nominal acumulada, da produção mensal e da demanda compulsória autorizada pela ANP em 2012. 3
- Figura 1.2.** Evolução anual da capacidade nominal acumulada, da produção e da demanda compulsória autorizada pela ANP no país. 3
- Figura 1.3.** Produção mensal de biodiesel por região brasileira. 4
- Figura 1.4.** Principais matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel. 5
- Figura 1.5 .** Reação de Transesterificação. 6
- Figura 3.1.** Sistema Instrumental para análise por FAES com detecção de emissão contínua. 25
- Figura 4.1. a)** Espectros de emissão de uma solução multielementar com 23 elementos a 4,0 mg/kg e Li 1,00 mg/kg em oleato de metila a 50 °C em diferentes chamas sem a correção da linha de base. 38
- Figura 4.1. b)** Espectros de emissão de uma solução multielementar com 23 elementos a 4,0 mg/kg e Li 1,00 mg/kg em oleato de metila a 50 °C em diferentes chamas com a correção da linha de base. 38
- Figura 4.2.** Espectro de emissão de uma solução organometálica multielementar com 23 elementos a 4,00 mg/kg e Li 1,00 mg/kg em oleato de metila. 39
- Figura 4.3.** Espectro de Emissão de uma solução 1,00 mg/kg de Na, K, Ca e Li. Em destaque a correção da linha de base. 43
- Figura 4.4.** Espectro de Emissão para uma solução multielementar de de Na, Ca, K 4,00 mg/kg e Li 1,00 mg/kg em oleato de metila. 44
- Figura 4.5.** Aumento da interferência espectral da emissão do Na em relação ao Ca com o aumento da concentração. 45

- Figura 4.6.** Curvas de calibração para Na, K e Ca. a), c) e e) com o uso de padrão interno, b), d) e f) sem considerar o padrão interno. 47
- Figura 4.7.** Efeito da temperatura na viscosidade absoluta de ésteres metílicos. 48
- Figura 4.8.** Variação da razão da emissão analito/Li com a temperatura. a) Na/Li, c) K/Li e e) Ca/Li. E variação da intensidade de emissão com a temperatura. b) Na, d) K e f) Ca. 49
- Figura 4.9.** Efeito da temperatura na taxa de aspiração da solução. 50
- Figura 4.10.** Avaliação da linearidade para concentrações do analito até 50,00 mg/kg. Intensidade de emissão. a) Na, c) K e e) Ca. Razão analito/padrão interno. b) Na/Li, d) K/Li e f) Ca/Li. 52
- Figura 4.11.** Distribuição das variâncias das respostas instrumentais (y) com o nível de concentração. a) Na, b) K e c) Ca. 55
- Figura 4.12.** Distribuição dos resíduos normalizados com o nível de concentração. a) Na, b) K e c) Ca. 56
- Figura 4.13.** Curvas de Limite de Previsão ampliadas na região de interesse e utilizadas para estimativar o Limite de Detecção (LD) e no Limite de Quantificação (LQ) no método de calibração externa com o uso de padrão interno e no método de calibração externa. a) Na/Li, b) K/Li, c) Ca/Li, d)Na, e) K e f)Ca. 66
- Figura 4.14.** Superfícies de Resposta para as intensidades de emissão dos analitos em função da variação do fluxo de gases. a) Na, b) K, c) Ca, d) Li. 70
- Figura 4.14.** Superfícies de Resposta para as intensidades de emissão dos analitos em função da variação do fluxo de gases. e) Na/Li, f) K/Li, g) Ca/Li. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Perfil de ácidos graxos em porcentagem em massa de alguns óleos vegetais e gorduras animais.	10
Tabela 1.2. Propriedades de biodieseis de diferentes oleaginosas.	11
Tabela 1.3. Especificação para o Biodiesel.	12
Tabela 1.4. Resumo dos procedimentos utilizados para determinação de metais em biodiesel.	16
Tabela 1.5. Algumas características de emulsões, nano- e microemulsões.	21
Tabela 3.1. Condições de operação do Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama.	26
Tabela 3.2. Amostras de biodiesel de diferente oleaginosas e rotas de síntese.	27
Tabela 3.3. Níveis de concentração da FLT.	32
Tabela 3.4. Descrição dos experimentos no ensaio de robustez.	35
Tabela 4.1. Propriedades do oleato de metila em comparação com as dos biodieseis.	36
Tabela 4.2. Comparação da curva de calibração nas diferentes chamas.	40
Tabela 4.3. Níveis de concentração da FLT.	54
Tabela 4.4. Inclinação obtida para diferentes curvas razão analito/Li.	57
Tabela 4.5. Inclinação obtida para diferentes curvas intensidade analito/Li.	58
Tabela 4.6. Comparação da inclinação das curvas de adição do Na, obtidas para diferentes matrizes, com a inclinação da curva de calibração. Curvas da razão Na/Li. ($y = a + bx$)	59

Tabela 4.7. Comparação da inclinação das curvas de adição do Na obtidas para diferentes matrizes com a inclinação da curva de calibração. Curvas de Intensidade de Emissão do Na. ($y = a + bx$)	60
Tabela 4.8. Comparação da inclinação das curvas de adição do K obtidas para diferentes matrizes com a inclinação da curva de calibração. Curvas da razão K/Li. ($y = a + bx$)	60
Tabela 4.9. Comparação da inclinação das curvas de adição do K obtidas para diferentes matrizes com a inclinação da curva de calibração. Curvas da Intensidade de Emissão do K. ($y = a + bx$)	61
Tabela 4.10. Comparação da inclinação das curvas de adição do Ca obtidas para diferentes matrizes com a inclinação da curva de calibração. Curvas da razão Ca/Li. ($y = a + bx$)	62
Tabela 4.11. Comparação da inclinação das curvas de adição do Ca obtidas para diferentes matrizes com a inclinação da curva de calibração. Curvas da Intensidade de Emissão do Ca. ($y = a + bx$)	63
Tabela 4.12. Resultados das quantificações das amostras pelo procedimento proposto e pelo procedimento normalizado ABNT NBR 15556.	68
Tabela 4.13. Resultados obtidos para o ensaio de robustez.	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANP- Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

BX- Mistura de biodiesel em diesel, em que X representa a porcentagem de biodiesel (%v/v)

B100- Biodiesel

CETENE- Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

CLP- Curva de Limite de Previsão

ET AAS- Espectrometria de Absorção Atômica com Atomizador Eletrotérmico

ETV ICP MS- Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado e Vaporização Eletrotérmica

FAAS- Espectrometria de Absorção Atômica em Chama

FAES- Espectrometria de Emissão Atômica em Chama

FLT- Faixa Linear de Trabalho

GF AAS- Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite

GLP- Gás Liquefeito de Petróleo

HR-CS FAAS- Espectrometria de Absorção Atômica em Chama de Alta Resolução com Fonte Contínua

ICP MS- Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado

ICP OES- Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado

LD- Limite de Detecção

LEC- Laboratório de Ensaio de Combustíveis

LIMA- Laboratório de Instrumentação e Metodologia Analítica

LMDR- Limite Mínimo de Desempenho Requerido

LMR- Limite Máximo Requerido

LQ- Limite de Quantificação

LS FAAS- Espectrometria de Absorção Atômica em Chama com Fonte de Linhas

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MMQP- Método dos Mínimos Quadrados Ponderados

MMQPR- Método dos Mínimos Quadrados Ponderados Relativo

MRC- Material de Referência Certificado

NBR- Normas Brasileiras

PNPB- Programa Nacional de Uso e Produção de Biodiesel

RSD- Desvio Padrão Relativo

TMAH- Hidróxido de Tetrametil Amônio

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	BIOCOMBUSTÍVEIS	1
1.2	BIODIESEL- CENÁRIO NACIONAL	2
1.2.1	Processos de Síntese	6
1.2.2	Características do Produto	9
1.2.3	Controle de Qualidade	11
1.2.4	Metais em Biodiesel	13
1.3	TÉCNICAS APLICADAS À DETERMINAÇÃO DE METAIS	14
1.4	PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRAS.....	17
1.4.1	Procedimentos de Digestão ácida para quantificação de metais em biodiesel	18
1.4.2	Diluição Direta com Solventes Orgânicos.....	19
1.4.3	Emulsões, nano- e microemulsões	20
1.4.4	Análise Direta de Biodiesel	22
2	OBJETIVOS.....	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	EQUIPAMENTOS	24
3.1.1	Sistema de medição de emissão atômica com chama.....	24
3.1.2	Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama	25
3.1.3	Outros Equipamentos.....	26
3.2	MATERIAIS, REAGENTES E SOLUÇÕES	26
3.3	AMOSTRAS	27
3.4	LIMPEZA DO MATERIAL	28
3.5	PREPARO DAS SOLUÇÕES	28
3.5.1	Soluções padrão.....	28
3.5.2	Soluções de amostras.....	29
3.5.3	Quantificação de Na, K e Ca.....	29
3.6	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS.....	29
3.6.1	Estudo de Chama	30
3.6.2	Vazão dos Gases.....	30
3.6.3	Fluxo da Solução	31
3.6.4	Efeito da Temperatura da Solução.....	31

3.7	VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO	31
3.7.1	Linearidade, Faixa Linear de Trabalho e Sensibilidade	32
3.7.2	Seletividade e Efeito de Matriz	33
3.7.3	Veracidade	33
3.7.4	Precisão	34
3.7.5	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	34
3.7.6	Robustez	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	37
4.1.1	O Tipo de Chama	37
4.1.2	A Vazão dos Gases e a Taxa de Aspiração da Solução	41
4.2	OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL	42
4.2.1	Interferências	42
4.2.2	O Uso do Li como Padrão Interno	46
4.2.3	O Efeito da Temperatura da Solução	48
4.3	VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO	51
4.3.1	Linearidade, Faixa Linear de Trabalho e Sensibilidade	51
4.3.2	Seletividade e Efeito de Matriz	58
4.3.3	Precisão	64
4.3.4	Limite de detecção e Limite de Quantificação	64
4.3.5	Veracidade	67
4.3.6	Robustez	69
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
6	CONCLUSÃO	74
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXO I.....	84
	ANEXO II.....	90
	ANEXO III.....	99

1 INTRODUÇÃO

No início dos anos 1970, o Brasil começou a implantar uma política de reestruturação da sua matriz energética, incluindo os denominados biocombustíveis, através do Programa Nacional do Álcool. Em 2005, através da Lei 11.097, foi introduzido o Biodiesel no país, incentivando a agricultura de subsistência familiar. A utilização de materiais na geração de biocombustíveis, como a cana-de-açúcar, mamona, pinhão manso, dentre outros, foi estimulada devido, principalmente, às crises do petróleo e a necessidade de diminuição da emissão dos gases, como o CO₂, que aumentam o Efeito Estufa. Todas as atividades referentes à produção, fiscalização, especificação e regulamentação dos biocombustíveis no Brasil são de responsabilidade da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis- ANP.

1.1 Biocombustíveis

A Lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005 define biocombustível como o combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.¹

No Brasil existem três tipos de biocombustíveis utilizados e em desenvolvimento atualmente. Os biocombustíveis de aviação, que incluem o bioquerosene, obtido principalmente por reações de transesterificação de óleos vegetais de baixa massa molar como óleo de coco e palma², o etanol combustível originado da fermentação do mosto de cana-de-açúcar³, e o biodiesel obtido através da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais.⁴⁻⁷

Existe ainda outro tipo de biocombustível, denominado diesel renovável, obtido pelo hidrotreamento de óleos vegetais. O hidrotreamento é um processo em que a matéria-prima é submetida a reação com hidrogênio para eliminar insaturações e grupos oxigenados da cadeia orgânica obtendo-se um hidrocarboneto com tamanho

de cadeia variável dependendo da matéria-prima utilizada.⁸ Este biocombustível não pode ser produzido e comercializado no Brasil por questões socioeconômicas, uma vez que somente a Petrobrás S.A. tem estrutura para produzir o diesel renovável.

1.2 Biodiesel- Cenário Nacional

A composição do biodiesel consiste de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais.⁹ O biodiesel puro é designado como B100,¹⁰ as misturas de biodiesel com diesel são denominadas BX, em que X representa a porcentagem de biodiesel adicionado ao óleo diesel.⁸

No Brasil existem atualmente 65 plantas industriais produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 20.567,76 m³/dia. Destas 65 plantas, 61 possuem autorização para comercialização do biodiesel produzido, correspondendo a 19.009,04 m³/dia.¹¹

No ano de 2012, a capacidade mensal de produção até o mês de outubro não apresentou uma evolução significativa, conforme apresentado na Figura 1.1. Isso pode ser um reflexo de que ainda no país a produção não é competitiva devido ao alto preço, sobretudo da matéria-prima. Analisando a Figura 1.1, observa-se ainda que a produção mensal é próxima da demanda compulsória estabelecida pela Agência, isso pode significar que as usinas estão produzindo apenas o mínimo exigido, uma vez que a capacidade de produção é cerca de duas vezes maior do que o produzido.

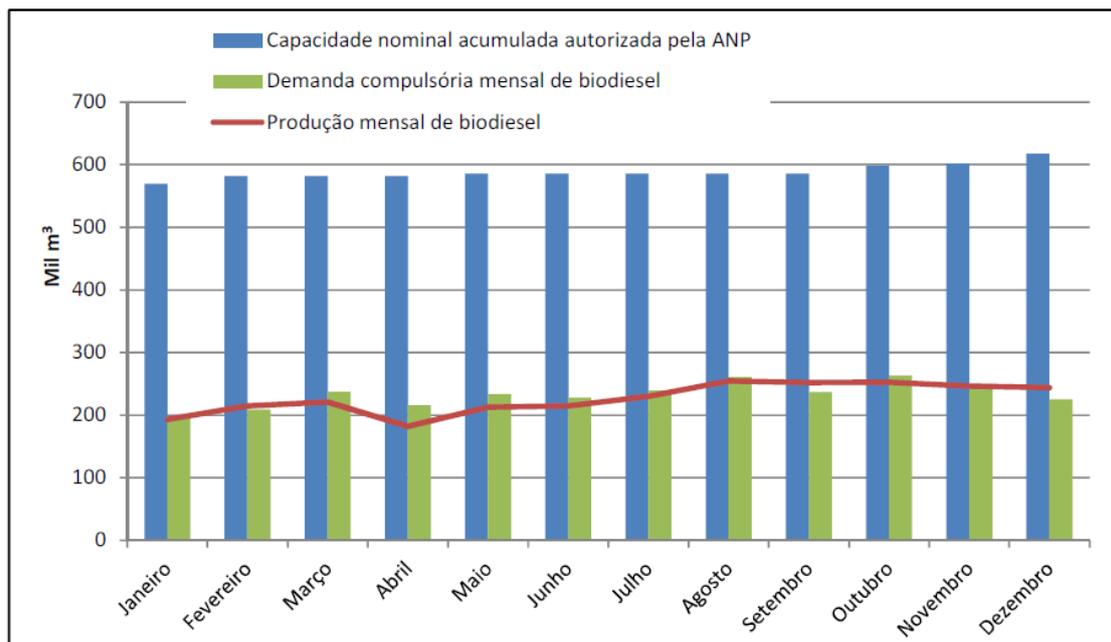


Figura 1.1. Evolução mensal da capacidade nominal acumulada, da produção mensal e da demanda compulsória autorizada pela ANP em 2012.¹¹

Comparando-se os dados de produção dos anos anteriores, observa-se um pequeno aumento da produção a partir de 2008, mas em todos os anos a produção está próxima da demanda compulsória, conforme mostrado na Figura 1.2.

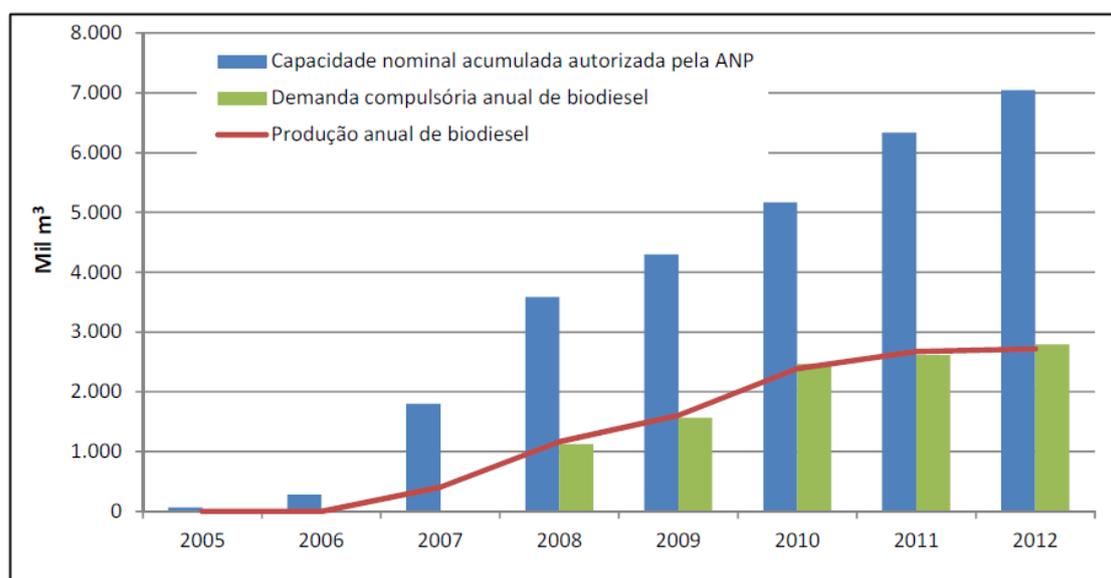


Figura 1.2. Evolução anual da capacidade nominal acumulada, da produção e da demanda compulsória autorizada pela ANP no país.¹¹

O cenário apresentado na Figura 1.2 mostra que a produção de biodiesel, iniciada no país no ano de 2005, ainda está em evolução. Ainda há muito a ser

desenvolvido em relação à tecnologia para produção, competitividade e produção da matéria-prima. Aliás, a baixa oferta de matéria-prima tem sido um dos principais obstáculos para a produção brasileira. Em uma análise da produção de biodiesel por região (Figura 1.3), observa-se que a maior produção de biodiesel está localizada na região centro-oeste, uma vez que esta região é a maior produtora de óleo de soja no país. A região Norte apresenta uma produção bastante inexpressiva assim como a região Sudeste, sendo que esta é a que mais consome combustível devido à densidade populacional.

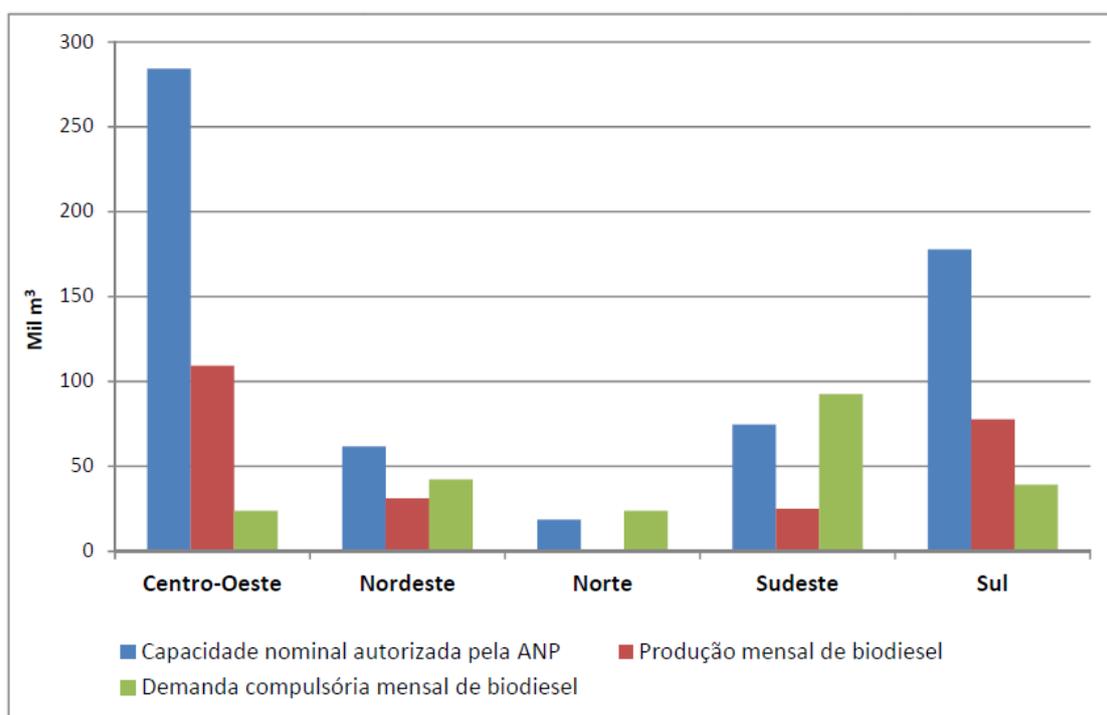


Figura 1.3. Produção mensal (dezembro/2012) de biodiesel por região brasileira.¹¹

Em relação à matéria-prima, observa-se na Figura 1.4 que o óleo de soja ainda é o principal óleo utilizado. Em seguida tem-se o sebo bovino e o óleo de algodão, que aos poucos vem ganhando espaço devido ao aumento de produção, sobretudo na região nordeste do país. As outras oleaginosas ainda não têm representatividade na produção nacional. A distribuição observada é devido à oferta e ao preço dessas matérias-primas. O Brasil é um dos maiores produtores de soja do mundo, o que justifica a maior produção de biodiesel a partir da soja.

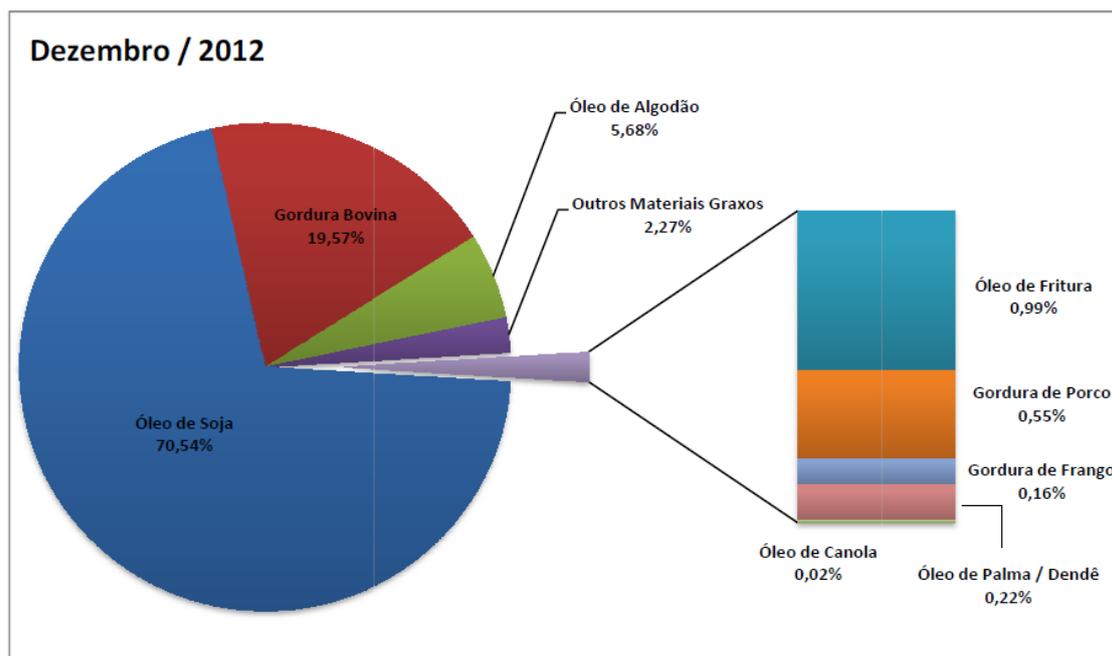


Figura 1.4. Principais matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel em dez/2012.¹¹

Através do Programa Nacional de Uso e Produção do Biodiesel- PNPB¹², o governo brasileiro promove o desenvolvimento da agricultura familiar para produção de matérias-primas e utilização de outras oleaginosas, principalmente o óleo de mamona, em substituição ao óleo de soja. No entanto, em função das propriedades físico-químicas desse óleo, como a elevada viscosidade que inviabiliza o processo produtivo do biocombustível, ele não é mais utilizado para produção de biodiesel. Existe a expectativa do não uso de matérias-primas utilizadas para produção de combustíveis que competem com a produção de alimentos.¹³ No entanto, no Brasil, apesar de um grande interesse em desenvolver a produção de oleaginosas como as palmáceas (palma e macaúba), ainda existem empecilhos para o seu desenvolvimento, devido a questões relativas à produção das mesmas e, em alguns casos, devido a gargalos tecnológicos, sendo estes de menor impacto, pois existem várias rotas sintéticas bem desenvolvidas relacionadas ao tipo de oleaginosa que se deseja utilizar.

1.2.1 Processos de Síntese

A rota clássica para a produção de biodiesel é a transesterificação do óleo vegetal ou gordura animal, representado por um triacilglicerol (TAG), com um álcool de cadeia curta na presença de catalisador, sob alta temperatura. A reação ocorre em três etapas, na primeira é obtida uma molécula de biodiesel e o diacilglicerol (DAG), na segunda obtém-se outra molécula de biodiesel e monoacilglicerol (MAG) e, por fim na terceira, obtém-se o glicerol e mais uma molécula de biodiesel.¹³ A reação é ilustrada na Figura 1.5.

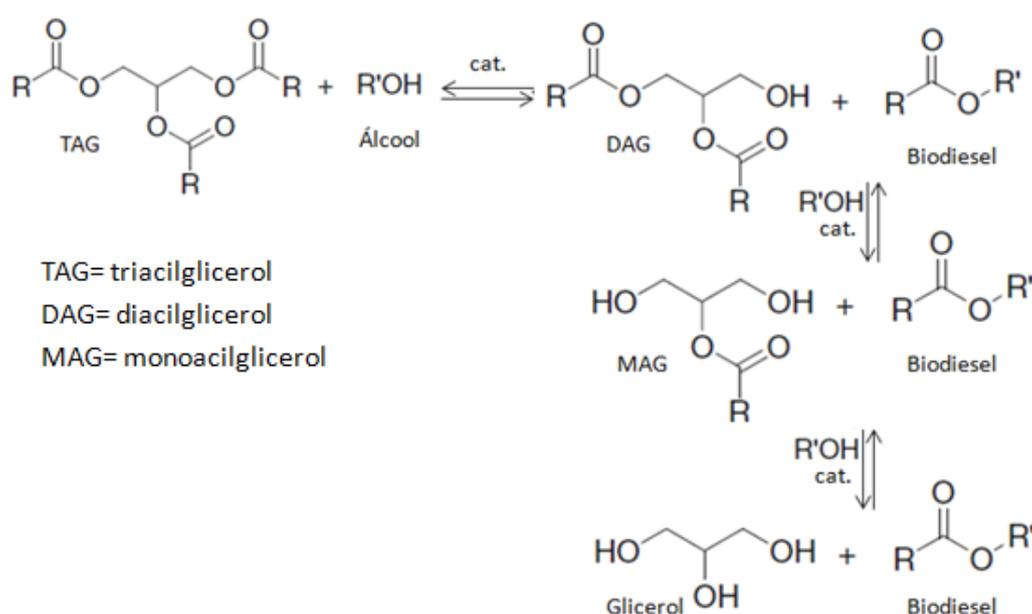


Figura 1.5. Equação da reação de Transesterificação.

O processo de obtenção de biodiesel é classificado de acordo com o tipo de catalisador utilizado.¹⁴⁻¹⁷ Usando este critério quatro categorias podem ser estabelecidas: catálise homogênea, catálise heterogênea, catálise enzimática e processos não catalíticos.¹⁹

Atualmente, a catálise homogênea é o processo mais desenvolvido e mais utilizado no Brasil e em outros países produtores de biodiesel. Ela pode ser classificada como catálise ácida ou básica. A catálise ácida é aplicada a matérias-primas com

elevado teor de ácidos graxos livres e o catalisador mais utilizado é o ácido sulfúrico.²⁰⁻
²⁷ A catálise homogênea básica se processa mais rápido que a catálise ácida.²⁸ Utiliza como catalisadores os hidróxidos ou metóxidos de sódio ou potássio, sendo que o metóxido de sódio é o catalisador com melhor desempenho.^{29,30} As condições clássicas dessa reação descrevem o uso de um excesso de álcool a uma razão molar álcool:TAG de 6:1 e 0,5% em massa do catalisador alcalino em relação ao TAG, com temperatura de operação de 60 °C, por um período de 1h.³¹ Após a reação o produto é submetido ao processo de purificação que inclui etapas como a separação do glicerol e lavagem do biodiesel com água para remoção do catalisador.

No Brasil, a transesterificação em presença de metanol catalisada por metóxido de sódio é o processo mais utilizado em controvérsia ao que é descrito na literatura,³¹ que aponta que no país a síntese de biodiesel utilizando o etanol é o processo mais aplicado devido à ampla produção brasileira desse álcool. Mesmo no Brasil o metanol é competitivo ao etanol para produção de biodiesel, devido aos incentivos fiscais do governo brasileiro.¹² A transesterificação utilizando metanol começa em um sistema bifásico, devido a baixa solubilidade do TAG nesse álcool, e o catalisador encontra-se na fase polar. A agitação do sistema promove a dispersão do TAG na fase alcóolica, e o mesmo é rapidamente convertido em éster metílico e glicerol. Uma vez que os intermediários de DAG e MAG são formados em suficiente quantidade durante a reação de transesterificação, eles servem como surfactantes que melhoram a transferência de massa de TAG para a fase alcóolica. A reação, eventualmente, transforma-se em outro sistema bifásico que consiste de um fase rica em éster e outra rica em glicerol. O catalisador é solubilizado pela fase polar. Quando cessada a agitação, há separação dessas fases e o catalisador é separado juntamente com o glicerol facilitando a etapa de purificação do produto. O uso de metóxido de sódio se deve, ao baixo custo desse catalisador, às questões cinéticas da reação e à menor taxa de formação de sabões. A reação com o metóxido não leva à formação de água diferentemente da reação catalizada por hidróxidos, a presença de água no meio reacional diminui o rendimento, devido ao deslocamento do equilíbrio da reação no sentido dos reagentes.³¹

A catálise heterogênea é aquela em que o substrato e o catalisador encontram-se em fases diferentes. No caso da produção de biodiesel, o catalisador é sólido ou está suportado em fase sólida e o substrato encontra-se na fase líquida. A vantagem desse processo encontra-se na etapa de purificação do produto, pois torna-se mais fácil separá-lo do catalisador quando os mesmos se encontram em fases distintas. A desvantagem é que os catalisadores heterogêneos são caros. Uma infinidade de catalisadores foram desenvolvidos e os mesmos são escolhidos de acordo com as condições de reação, as características físico-químicas e composição do substrato, dentre outros fatores, em geral, as zeólitas são os catalisadores mais utilizados.³²

A síntese de biodiesel por transesterificação e/ou a esterificação utilizando catálise enzimática é uma interessante rota sintética. Ela é aplicada a uma grande variedade de óleos como soja, sebo, óleos residuais, dentre outros além de ser aplicada ainda a óleos de elevada acidez e com concentrações significativas de água. Um pequeno excesso de álcoois, como o metanol, etanol ou propanol, fornece um rendimento elevado de biodiesel em condições suaves, 20-60 °C.³³

Dentre os processos catalíticos acima citados, todos apresentam vantagens e desvantagens. No que se refere à catálise homogênea ácida, a vantagem é que ocorrem, simultaneamente, a esterificação de ácidos graxos livres e a transesterificação dos triacilgliceróis. A desvantagem é que a reação é relativamente lenta, o meio é bastante corrosivo, e são gerados quantidades relativamente altas de resíduos devido à etapa de neutralização do produto. A catálise homogênea básica é vantajosa no sentido de ser bastante rápida, no entanto, é necessário fazer o pré-tratamento da matéria-prima para eliminar água e ácidos graxos livres, a etapa de purificação é laboriosa; pois pode ocorrer formação de sabões e emulsões.³² A vantagem da catálise enzimática é que tanto os triacilgliceróis quanto os ácidos graxos livres podem ser convertidos simultaneamente em biodiesel, pois ela atua eficazmente tanto na transesterificação e esterificação.³³ A desvantagem é que os biocatalisadores apresentam custo elevado, sendo necessário o desenvolvimento de sistemas reutilizáveis e com longos tempos de operação.³⁴⁻³⁶

Dentre os processos não catalíticos tem-se a metanólise supercrítica de biodiesel. Trata-se de um método de produção que opera a alta temperatura e alta pressão. O nome é devido à utilização do metanol em condições supercríticas. As propriedades do metanol nesse estado facilita a rápida transesterificação dos triacilgliceróis e a esterificação dos ácidos graxos livres, sem que seja necessário o uso de catalisador.¹⁸ Altas taxas de conversão (>98%) são alcançadas em curtos tempos de reação (4 min.)³⁷ Nesse processo, contaminantes presentes na matéria-prima facilitam a conversão ao invés de impedi-la e as etapas de purificação consistem apenas na evaporação do álcool e na separação do glicerol.^{38,39}

1.2.2 Características do Produto

As propriedades físico-químicas do biodiesel são muito pouco influenciadas pelo tipo de processo reacional ao qual a matéria-prima foi submetida. No entanto, as características do óleos são os fatores que determinam essas propriedades.¹³ Na Tabela 1.1, tem-se os principais óleos utilizados para produção de biodiesel bem como a sua composição.

Tabela 1.1. Perfil de ácidos graxos em porcentagem em massa de alguns óleos vegetais e gorduras animais^a

Ácido Graxo	% (m/m) de ácidos graxos em óleo vegetal e gordura animal								
	Canola	Palma	Soja	Girassol	Milho	Algodão	Coco	Gordura de Frango	Sebo Bovino
C6:0							1		
C8:0							7		
C10:0							7		
C12:0							47		1
C14:0						1	18	1	4
C16:0	4	45	11	6	11	23	9	25	26
C18:0	2	4	4	5	2	2	3	6	20
C20:0									
C22:0				1					
C16:1						1		8	4
C18:1	61	39	23	29	28	17		41	28
C18:2	22	11	54	58	58	56	6	18	3
C18:3	10		8	1	1		2	1	
C20:1	1								
Outros									14

C6:0 caproato de metila, C8:0 caprilato de metila, C10:0 caprato de metila, C12:0 laurato de metila, C14:0 miristrato de metila, C16:0 palmitato de metila, C18:0 estearato de metila, C20:0 araquidato de metila, C22:0 behenato de metila, C16:1 palmitoleato de metila, C18:1 oleato de metila, C18:2 linoleato de metila, C18:3 linolenato de metila, C20:1 eicosenoato de metila.^a Adaptada de Gunstone⁴⁰

Observa-se que para a maioria dos óleos a composição majoritária consiste de cadeias com 18 átomos de carbono, exceto para o óleo de coco, cuja composição é dominada por cadeias menores com 12 e 14 átomos de carbono. Além disso, propriedades como a viscosidade cinemática, ponto de entupimento a frio, estabilidade oxidativa, densidade, ponto de ebulição, são todas influenciadas pelo perfil apresentado na Tabela 1.1. Na Tabela 1.2 apresentam-se algumas propriedades físico-químicas e parâmetros definidos na legislação⁹, que dependem exclusivamente do tipo de oleaginosa empregada como matéria-prima.

Tabela 1.2. Propriedades de biodieseis de diferentes oleaginosas^a

Propriedade	Canola	Palma	Soja	Girassol	Milho	Pinhão Manso	Algodão ^b	Coco	Óleo Residual	Sebo Bovino
Enxofre total, mg/kg	2	2	2	-	4	5	-	3	5	7
Viscosidade Cinemática a 40 °C, mm ² /s	4,4	4,6	4,3	4,1	4,2	4,8	3,8 ^b	2,8	4,8	4,7
Ponto de entupimento de filtro a frio, °C	-9	9	-4	-2	-8	-	-	-5	13	1
Ponto de fulgor, °C	153	163	159	175	171	152	160 ^b	113	161	124
Número de Cetano	53,7	61,9	51,3	51,1	55,7	55,7	42,0 ^b	59,3	56,9	58,9
Índice de Iodo, g/100g	108,8	54,0	125,5	128,7	101,0	109,5	108,5 ^c	18,5	88,9	65,9
Massa Específica a 20 °C, kg/m ³	883	873	882	878	883	876	887 ^d	874	879	878

^a Adaptada de Hoekman⁴, ^b Kralova e Sjöblom⁴¹, ^c Aricetti *et al.*⁴², ^d Cavalcante.⁴³

Um biodiesel constituído majoritariamente por cadeias longas e saturadas apresentará propriedades a frio piores do que um biodiesel constituído majoritariamente por cadeias menores e saturadas. Analogamente, um óleo composto por grandes percentuais de cadeias insaturadas apresentará baixa estabilidade oxidativa em comparação a um óleo saturado. Essas comparações são bem discutidas na literatura.⁴ Contudo é importante ressaltar que para produzir biodiesel é necessário ter-se em mente que o produto obtido deverá atender às especificações definidas pela ANP. Além do desenvolvimento do método sintético, o pesquisador precisa estar atento para que seu produto atenda a tais especificações, para isso é necessário um rigoroso controle de qualidade.

1.2.3 Controle de Qualidade

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis-ANP, é o órgão responsável por estabelecer os critérios de controle da qualidade do biodiesel.

Todos os parâmetros, os limites, assim como os procedimentos normalizados para avaliação dos mesmos encontram-se na Tabela 1.3.

Tabela 1.3. Especificação para o Biodiesel.⁹

Característica	Unidade	Limite	Método		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Massa Específica a 20 °C	kg/m ³	850-900	7148 14065	1298 4052	ENISO3675 ENISO12185
Viscosidade Cinemática a 40 °C	mm ² /s	3,0-6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de Água, máx.	mg/kg	500	-	6304	ENISO12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	ENISO12662
Ponto de fulgor, mín.	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103
Resíduo de carbono	% massa	0,050	15586	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	50	-	5453	ENISO20846 ENISO20884
Sódio+ Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15553 15555 15556	-	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Cálcio+Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao Cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número de Cetano	-	Anotar	-	613 6890	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	EN 14104
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 15771	6584	EN14105 EN 4106
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344	6584	EN 14105
Mono, di, triacilglicerol	% massa	Anotar	15342 15344	6584	EN 14105
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de Iodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação a 110 °C, mín.	h	6	-	-	EN 14112

(1) Límpido e isento de impurezas com anotação da temperatura de ensaio.⁹

Alguns desses parâmetros da Tabela 1.3, como viscosidade cinemática, massa específica, ponto de entupimento a frio e estabilidade à oxidação, são características que dependem do tipo de oleaginosa utilizada, conforme discutido anteriormente. Outros parâmetros como corrosividade ao cobre, contaminação total,

teor de água, são uma forma de avaliar se o transporte e o armazenamento do produto foram adequados. Já os parâmetros como teor de ésteres, mono, di e triacilglicerol indicam se a reação teve um rendimento adequado. Por fim, glicerol livre, glicerol total e os teores dos metais e metaloides são característicos do processo reacional e podem ser um reflexo da eficiência da etapa de purificação do produto. Mas além de avaliar o processo produtivo, o transporte e o armazenamento, esses parâmetros são também utilizados para controlar e prevenir danos ao veículo que o utiliza, a estabilidade do produto, controle da emissão de gases e contaminação do meio ambiente.

1.2.4 Metais em Biodiesel

Conforme descrito anteriormente, a determinação de metais em biodiesel é um parâmetro do controle de qualidade definido pela legislação.⁹ A presença de metais pode resultar numa série de problemas, pode promover a aceleração da decomposição do biocombustível, catalisando reações de oxidação, reduzindo sua estabilidade térmica e eficiência, contribuindo para a corrosão das partes internas do motor,⁴⁴⁻⁴⁶ além de poder atuar no envenenamento do catalisador do sistema de escapamento do veículo, contribuindo para o aumento da poluição atmosférica.⁴⁷⁻⁴⁸

Os elementos traços podem ser incorporados ao biodiesel durante a extração do óleo ou da gordura e durante a síntese, lavagem, refino, transporte e armazenamento.⁴⁶ Podem ainda ser originários da planta em função do ambiente em que esta se desenvolveu.^{50,51} O tipo de metal presente no produto depende do tipo de rota sintética que foi aplicada na produção do biodiesel. Sódio e potássio tem sua origem nos catalisadores quando é aplicada a rota clássica. Na catálise heterogênea, outros metais são incorporados dependendo do tipo de catalisador utilizado, muitas vezes os metais que compõem os catalisadores heterogêneos não fazem parte do escopo definido na especificação do biodiesel. A catálise enzimática e a reação supercrítica não contribuem para a presença de metais no produto. Fósforo e enxofre são incorporados ao óleo utilizado na síntese porque são extraídos, juntamente com os

óleos vegetais, na forma de fosfolipídeos e glucosinatos,^{52,53} cálcio e magnésio são oriundos da água de lavagem e da oleaginosa.^{52,54}

A especificação do biodiesel definida pela ANP foi baseada na rota clássica, que como discutido anteriormente, é a mais aplicada no país. O monitoramento de Na, K, Ca e Mg é necessário devido a sua capacidade de formar sabões insolúveis e sólidos abrasivos, resultando em depósitos nos filtros dos veículos contribuindo com o desgaste e corrosão de partes do motor.⁴⁴⁻⁴⁶ O fósforo atua no envenenamento dos catalisadores e no aumento da formação de gomas.^{52,53}

1.3 Técnicas Aplicadas à Determinação de Metais

Os procedimentos normalizados definidos pela legislação brasileira são baseados na utilização de técnicas como a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) e Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), como por exemplo, as NBR's 15556 e 15553, respectivamente.^{52,54} Uma quantidade considerável de procedimentos são descritos na literatura, no que se refere a determinação de metais em biodiesel e também em óleos vegetais.⁵⁵

As técnicas que envolvem Espectrometria de Absorção Atômica tem sido bastante empregadas na determinação de metais em biodiesel. A Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ET-AAS), como por exemplo, a que utiliza filamento de tungstênio para realizar a pirólise, é particularmente vantajosa devido à sua sensibilidade, robustez e tolerância a matrizes orgânicas que são eliminadas na fase de pirólise diminuindo ou eliminando os possíveis interferentes.⁴⁷ A Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF-AAS) é outra técnica que apresenta alta sensibilidade e boa precisão mesmo para amostra complexas, esses fatores podem ser melhorados com a escolha do programa de aquecimento e com o uso de modificadores químicos que minimizam as interferências.⁵⁶⁻⁵⁸ Por sua vez, a Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) traz vantagens evidentes devido aos baixos custos de aquisição e manutenção, sensibilidade e simplicidade^{59,60}

Dentre as técnicas aplicadas à determinação de metais em biodiesel baseadas na emissão atômica pode-se citar a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) e Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS). A vantagem dessas técnicas é o caráter multielementar e a sensibilidade elevada. A desvantagem é que são técnicas que apresentam alto custo de instalação e manutenção.

A Tabela 1.4 apresenta um resumo das técnicas espectrométricas e não espectrométricas aplicadas à determinação de metais em biodiesel, os tipos de biodieseis analisados, dos metais quantificados, o método de preparo da amostra e a técnica aplicada para determinação.

Tabela 1.4. Resumo dos procedimentos utilizados para determinação de metais em biodiesel.

Biodiesel	Preparo da amostra	Metais analisados	Técnica	Ref.
Algodão, nabo forrageiro, mamona, soja, resíduos de fritura	Diluição em etanol	Al, Cu, Fe e Mg	ET-AAS	46
Soja, algodão, mamona, resíduos de fritura	Microemulsão	Co, Cu, Fe, Mn, Ni e V	GF-AAS	48
Mamona, soja, aldoão, gordura animal, nabo forrageiro, girassol	Microemulsão	Cd, Pb e Tl	GF-AAS	56
Não informado	Microemulsão e Digestão	Cu, Pb, Ni e Cd	GF-AAS	57
Não informado	Análise direta	P	GF-AAS	58
Mamona, soja, canola, algodão, babassu, girassol	Diluição em xileno	Na, K, Mg e Ca	LS FAAS e HR-CS FAAS	59
Não informado	Microemulsão	Na, K, Mg e Ca	FAAS	60
Soja, girassol, Colza	Microemulsão	Na e K	FAAS	61
Soja, mamona, gordura animal, girassol, colza	Microemulsão	Ca e Mg	FAAS	62
Soja, resíduos de fritura, algodão, sebo	Microemulsão	S	ICP OES	63
Soja, colza, sebo de porco, gordura de frango	Diluição em querosene	Mg, Cr, V, Mn, Be e S	ICP-MS	64
Palma Africana, mamona, palma, soja	Microemulsão	Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Ti, Zn	ICP-MS	65
Não informado	Diluição em querosene	Na e K	FAES	66
Nabo forrageiro, soja, algodão, resíduos de fritura	Microemulsão	Na e K	FAES	67
Soja, gordura animal, girassol, algodão, canola	Diluição em etanol	Na e K	FAES	68
Soja, sebo, canola, óleo residual, algodão, macaúba, milho, girassol	Microemulsão	Na e K	FAES	69
Resíduos de fritura, mamona, soja	Extração	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ e Ca ²⁺	Eletroforese capilar	70
Não informado	Extração	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ e Ca ²⁺	Eletroforese capilar	71
Não informado	Microemulsão	Pb ²⁺ e Cu ²⁺	Voltametria de redissolução	72
Não informado	Análise direta	P e Si	ETV-ICP-MS	73
Soja, girassol, algodão, sebo	Decomposição	Na	FAES	77
Não informado	Diluição em etanol	Ca, P, Mg, K e Na	ICP OES	82
Soja, canola, algodão, amendoim	Microemulsão	As	GF-AAS	84
Palma Africana, mamona, palma, soja	Microemulsão	Ca, Mg e Zn	FAAS	85
Algodão, mamona, nabo forrageiro, soja, resíduo de fritura, sebo	Tratamento com TMAH	Cu e Fe	ET-AAS	86

Conforme mostrado na Tabela 1.4, a literatura apresenta a descrição de trabalhos que utilizaram a Espectrometria de Emissão Atômica em Chama (FAES). FAES é uma técnica simples, de baixo custo e que apresenta elevada sensibilidade para determinações de Na e K. Para realizar quantificações empregando FAES é necessário que os analitos estejam em solução, pois para introdução no equipamento a primeira etapa consiste na aspiração da solução seguida da formação de um aerosol no nebulizador. O aerosol é então misturado com os gases combustível e oxidante que alimentam a chama, essa mistura é então arrastada até o queimador. Na chama o aerosol é decomposto em átomos que são excitados pelo calor da chama, quando esses átomos retornam ao estado fundamental, eles emitem radiação que é mensurada pelo sistema de detecção.

Nowka⁶⁶ determinou Na, K em amostras de biodiesel diluídas em solvente orgânico utilizando a emissão em chama em comparação com a absorção atômica, obtendo resultados satisfatórios. A determinação de Na e K utilizando a FAES é reportada na literatura, sendo que as únicas diferenças entre os mesmos são os procedimentos de preparação da amostra.^{67,68} Raposo *et al.*⁶⁹ desenvolveu um procedimento para determinação simultânea de Na, K e Ca em FAES, pelo método do padrão interno com o Li e a introdução por microemulsão. Poucos trabalhos são apresentados na literatura nesta área, pois FAES é uma técnica limitada à quantificação apenas dos elementos alcalinos e do cálcio.

1.4 Procedimentos de Preparo de Amostras

O preparo da amostra é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de um procedimento analítico. O procedimento de preparo está diretamente relacionado a técnica de análise escolhida para determinação dos analitos.⁷³ No caso das técnicas espectrométricas, discutidas anteriormente e consideradas mais adequadas para determinação de metais em biodiesel, é necessário que os analitos estejam em solução. A quantificação de metais em biodiesel é dificultada devido à baixa concentração dos analitos, o que requer o emprego de

técnicas sensíveis, a elevada viscosidade, que dificulta a introdução da amostra no equipamento e o elevado conteúdo orgânico da matriz que aumenta a possibilidade de interferência durante a análise.⁵⁵ A seguir são apresentados alguns procedimentos descritos na literatura que foram utilizados no preparo das amostras para determinação de metais em biodiesel.

1.4.1 Procedimentos de Digestão ácida para quantificação de metais em biodiesel

A determinação de elementos em amostras de natureza orgânica, como o biodiesel, constitui um problema analítico, pois normalmente, é necessária a transformação dos analitos, presentes na matriz orgânica em uma forma inorgânica simples.⁷⁴ Uma forma de eliminar a matriz orgânica é a digestão e/ou decomposição da amostra que resulta numa solução aquosa que, em princípio, pode ser analisada por qualquer técnica espectrométrica com a calibração sendo feita com padrões aquosos.^{75,76}

De Oliveira *et al.*⁷⁷ elaboraram um procedimento de decomposição a seco de uma amostra de biodiesel em forno mufla. O procedimento descreve o aquecimento da mostra a 250 °C por 1h para secagem e em seguida a temperatura foi aumentada progressivamente até 600 °C por 4h para decompor a matriz. Os resíduos inorgânicos foram dissolvidos em solução de ácido nítrico 1% v/v e transferidos para balão volumétrico e o volume completado com água deionizada. Após o preparo, Na foi quantificado por FAES. Esse foi o único procedimento de digestão encontrado na literatura para matriz de biodiesel. Geralmente, os trabalhos relatam a diluição da amostra em solventes orgânicos, que será abordado a seguir.

Alguns procedimentos são descritos para a determinação de metais, como Cd, Pb, Al, Cu, Ca, etc. em óleos vegetais, como por exemplo, azeite de oliva, óleo de milho e óleo de girassol, com a digestão da amostra com HNO₃ e H₂O₂ assistida por radiação micro-ondas e quantificação por GF AAS,⁷⁸⁻⁸⁰ ICP OES e ET-AAS.⁸¹

A decomposição da amostra apresenta vantagens em relação à análise direta, neste caso as interferências da matriz são minimizadas e podem ser utilizados padrões aquosos para calibração. No entanto, dependendo do método de decomposição, muitas vezes é exigido o uso de equipamentos sofisticados, como fornos de micro-ondas e fontes de radiação ultra-violeta; o emprego de elevadas temperaturas e ácidos concentrados de difícil manipulação. Os métodos de decomposição são, às vezes, muito complexos e podem implicar em perdas do analito. No caso das técnicas espectrométricas que empregam a nebulização, uma fonte de erro resultante da digestão incompleta das amostras é a interferências causada por substâncias orgânicas com mudança na viscosidade e na tensão superficial da solução a ser analisada fazendo com que as taxas de nebulização das soluções de amostras sejam diferentes das taxas de nebulização das soluções de calibração.⁷⁴

1.4.2 Diluição Direta com Solventes Orgânicos

A diluição direta com solventes orgânicos consiste na simples solubilização da amostra em um solvente apropriado, como xileno, querosene, tolueno, etc.. Os procedimentos recomendados na Resolução nº 7 são baseados na diluição do biodiesel por um fator de 10 vezes, utilizando como solventes o xileno ou o querosene (ABNT NBR 15553) e xileno ou cicloexano (ABNT NBR 15556). Esses solventes apresentam alta toxicidade podendo causar sérios danos à saúde do analista a curto e longo prazo, podem causar uma série de problemas ao equipamento como decomposição de componentes poliméricos, borrachas e anéis de vedação, capilares, dentre outros, com isso é necessário realizar adaptações no equipamento quando a rotina do laboratório envolve análises orgânicas para com isso elevar a vida útil do sistema, mas essas adaptações envolvem elevados custos de manutenção.

A diluição de amostras de biodiesel na proporção 1:3 m/m foi realizada com querosene para a determinação de vários elementos como Na, K, S, Mg, Ni, etc. por ICP-MS.⁶⁴ Cálcio, Cl, K, Na, Mg e P foram determinados a partir de uma solução biodiesel: querosene 1:4 m/m através de ICP-OES.⁴⁵ Três trabalhos tratam da

dissolução das amostras de biodiesel em etanol, no primeiro a solubilização foi utilizada para determinar Al, Cu, Fe e Mn em ET-AAS,⁴⁶ no segundo para determinar Na e K por FAES,⁶⁸ e no terceiro para quantificar Na, K, Ca, Mg e P em ICP OES.⁸² O uso de etanol como solvente é um interessante alternativa pois esse solvente é de baixo custo, fácil manipulação e baixa toxicidade.

A diluição em solventes orgânicos implica na diluição do próprio analito exigindo técnicas com elevada sensibilidade. Outro fator é a elevada toxicidade que alguns desses solventes apresetam que podem resultar em sérios riscos à saúde do trabalhador. A vantagem é a diminuição dos problemas associados a alta viscosidade das amostras de óleos.⁵⁵

1.4.3 Emulsões, nano- e microemulsões

Emulsões, nano- e microemulsões são sistemas coloidais constituídos de matéria não cristalina dotada de organização, composto por dois líquidos um polar e outro apolar, em que um dos líquidos está disperso e o outro é a fase contínua. A classificação de emulsões, nano- e microemulsões é feita por Burguera⁸³ de acordo com a composição e o tamanho das partículas coloidais. Emulsões são definidas como sistemas cineticamente estáveis, obtidos pela dispersão de um líquido (dispersante) em outro (fase contínua). As emulsões em que o óleo está disperso em água são do tipo O/W, já as que a água está dispersa em óleo são do tipo W/O, os tamanhos de partículas variam de 0,5-50 μm , elas são soluções brancas e opacas. Nanoemulsões são aqueles sistemas coloidais obtidos pela mistura de dois líquidos imiscíveis e um surfactante (não-iônico ou polimérico) e um co-solvente, particularmente um álcool de cadeia longa, os tamanhos de partículas variam entre 0,05-0,5 μm , elas podem ser translúcidas ou opacas. Microemulsões são sistemas de três componentes opticamente transparentes e termodinamicamente estáveis, constituídos de um líquido polar, um não-polar, um surfactante frequentemente em combinação com um álcool de cadeia curta, os tamanhos de partículas variam entre 0,01-0,10 μm . Ainda

nesse *Review*, Burguera apresenta uma Tabela em que é possível fazer facilmente a classificação do sistema obtido de acordo com suas características, Tabela 1.5.⁸³

Tabela 1.5. Algumas características de emulsões, nano- e microemulsões

Parâmetro	Emulsão	Nanoemulsão	Microemulsão
Formação	Agitação mecânica ou manual	Homogeneização a alta pressão ou ultrassônica	Espontânea
Estável	Cineticamente	Cineticamente	Termodinamicamente
Tamanho de partícula (µm)	0,5-50	0,05-0,5	0,01-0,10
Aparência	Opaca	Transparente ou Opaca	Transparente
Área superficial (m²/g)	Baixa (15)	Moderada (50-100)	Alta (200)
Tensão superficial	Baixa	Baixa	Ultra Baixa
Tipo de sistema	W/O, O/W ou W/O/W e O/W/O	W/O ou O/W	W/O, O/W e Bicontínuo
Concentração de surfactante	Baixa	Moderada	Alta
Tipo de co-surfactante	Nenhum	Álcool de cadeia longa	Álcool de cadeia curta

W/O água/óleo, O/W óleo/água, W/O/W água/óleo/água e O/W/O óleo/água/óleo.

Devido às características desses sistemas, eles tem sido amplamente utilizados na determinação de metais em biodiesel. É relatado o uso de uma microemulsão composta pela mistura de biodiesel, água, HNO₃ e o n-propanol como co-solvente. Silva *et al.*⁵⁶ utilizou esse sistema para determinação de Cd, Pb e Tl com GF-AAS. Lyra *et al.*⁶⁰ determinaram Na, K, Ca e Mg por FAAS. Outro trabalho⁶⁷ relata a quantificação dos elementos Na e K por emissão em chama. Arsênio foi determinado em óleo vegetal e biodiesel também por GF-AAS.⁸⁴

Outro sistema bastante utilizado para determinar metais em biodiesel é composto por biodiesel, água, Triton X-100 como surfactante e como co-solventes tem-se utilizado o n-propanol, n-butanol e o n-pentanol. Raposo utilizou esse sistema para determinar simultaneamente Na, K e Ca por FAES.⁶⁹ Jesus *et al.* quantificaram Na, K, Ca e Mg por FAAS,^{61,62} Amais *et al.* quantificaram Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Ti e Zn com o uso de um ICP-MS,⁶⁵ e Ca, Mg e Zn usando nebulização discreta em FAAS.⁸⁵ O enxofre foi quantificado por ICP-OES.⁶³

Ghisi *et al.*⁸⁶ descrevem a obtenção de uma solução aquosa transparente obtida pela mistura de 500 µL de hidróxido de tetrametilamônio 25% m/v, 500 mg de biodiesel e o volume completado para 5 mL com água após o aquecimento a 90°C por 5 min.. Com esse sistema foi feita a quantificação de Cu e Fe com ET-AAS.

As principais vantagens da utilização de emulsões ou microemulsões em química analítica são que elas não requerem a decomposição prévia da matriz da amostra, ou a utilização de solventes orgânicos como diluentes, e comportam-se de forma semelhante às soluções aquosas, permitindo a utilização de soluções padrão aquosas para calibração.⁸³ Contudo, o uso de microemulsões exige a combinação adequada dos reagentes, longos tempos de preparo das amostras e muitas vezes limitação do tempo de utilização das soluções, devido a estabilidade das mesmas.

1.4.4 Análise Direta de Biodiesel

A análise direta de metais em biodiesel não é um processo óbvio, devido às características físico-químicas da amostra, como alta viscosidade e alta complexidade da matriz. Foi feita a determinação de fósforo em amostras de biodiesel com o uso de uma solução de Pd com Triton X-100 como modificador químico e a quantificação foi feita por GF-AAS utilizando padrões aquosos para calibração. Obteve-se um limite de quantificação de 1,2 µg/g e os resultados foram concordantes com o procedimento normalizado indicado na legislação brasileira.⁵⁸

A principal vantagem da análise direta é a mínima manipulação da amostra, resultando em menores chances de perda dos analitos e de contaminação, bem como maior rapidez, menores custos da análise e menor erro na estimativa dos resultados.. No caso das técnicas espectrométricas com o uso de nebulização, as desvantagens da análise direta de biodiesel são as dificuldades introdução da amostra devido a sua elevada viscosidade, produção de uma chama rica em combustível, o que dificulta a queima total da matéria orgânica e a possibilidade de interferências devido à complexidade da matriz.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo geral o desenvolvimento de um procedimento para quantificação direta e simultânea de Na, K e Ca em amostras de biodiesel com o uso da técnica de Espectrometria de Emissão Atômica em Chama em conjunto com um Detector de Emissão Contínua.

Os objetivos específicos a serem abordados são:

- Otimização das condições instrumentais como composição da chama, taxa de aspiração, fluxo de gases;
- Verificação dos possíveis interferências espectrais e não espectrais;
- Validação do procedimento avaliando as figuras de mérito: seletividade, sensibilidade, linearidade, efeito de matriz, precisão, veracidade, robustez, os limites de quantificação e de detecção;
- Quantificação de Na, K e Ca em amostras de biodiesel pelo procedimento proposto e comparação com os resultados obtidos pelo procedimento normalizado definido na legislação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

3.1.1 Sistema de medição de emissão atômica com chama

As medidas foram realizadas em um equipamento de medição de emissão atômica com chama, adaptado pelo Laboratório de Instrumentação de Metodologia Analítica (LIMA) da UFMG, composto por um sistema de nebulizador-combustor de um fotômetro de chama da Evans Electroselenium Ltda. (Essex, England) em conjunto com o detector EPP2000 StellarNet. O equipamento foi conectado a um computador com o programa SpectraWiz em ambiente operacional Windows®.

As respostas instrumentais foram obtidas a partir dos espectros de emissão contínua registrados pelo detector com auxílio de uma fibra óptica. O tratamento do espectro obtido para correção da linha de base foi realizado em planilhas desenvolvidas no programa Excel®. As medidas dos sinais analíticos foram baseadas na altura do pico de emissão.

O esquema do sistema instrumental utilizado para análise por espectrometria de emissão atômica em chama (FAES) com detector de emissão contínua é representado na Figura 3.1.

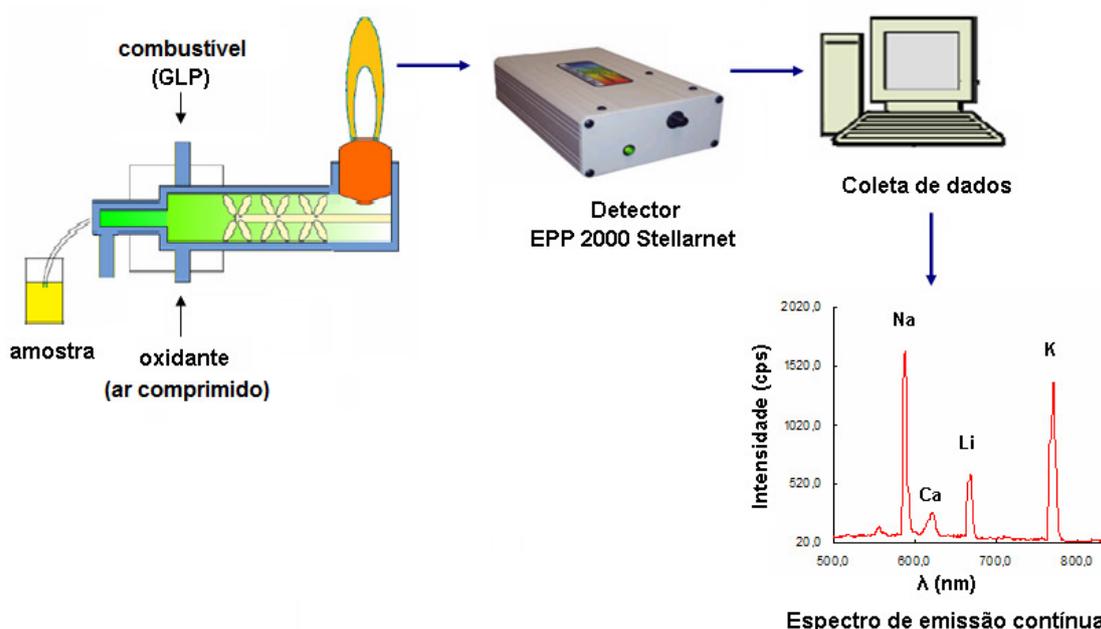


Figura 3.1. Sistema Instrumental para análise por FAES com detecção de emissão contínua.

Utilizou-se como oxidante ar sintético medicinal fornecido pela Ar Liquide do Brasil Ltda. (Contagem, Brasil) ou pela Linde Gases Ltda. (Contagem, Brasil). Como gás combustível utilizou-se gás liquefeito de petróleo (GLP) comercializado pela SuperGasbras (Betim, Brasil).

3.1.2 Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama

A quantificação pelo procedimento normalizado ABNT NBR 15556 e o estudo de chama foram realizadas em Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama (AAAnalyst 400- PerkinElmer, EUA), lâmpada multielementar Na e K, e lâmpada multielementar Ca e Mg (PerkinElmer, EUA). Os gases utilizados foram ar comprimido, Acetileno e Óxido Nitroso fornecidos pela Linde Gases Ltda. (Contagem, Brasil). A taxa de aspiração da amostra foi regulada de forma manual com o objetivo de se obter a maior resposta instrumental. Outras condições de operação encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Condições de operação do Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama

Parâmetro	Valor Ajustado		
Chama ar/Acetileno	10,0 e 2,5 L/min		
Chama C ₂ H ₂ /N ₂ O	7,5 e 6,5 L/min		
Tempo de integração	10 s		
Analito	Na	K	Ca
Corrente da Lâmpada (mA)	12	12	15
Largura da Fenda (mm)	1,8	2,7	2,7
Comprimento de onda (nm)	589,00	766,49	422,67

3.1.3 Outros Equipamentos

Para homogeneização das soluções foi utilizado agitador Vortex da Labnet International, Inc., operando a uma velocidade de rotação de 3400 rpm.

Balança analítica calibrada da Shimadzu modelo AY220 com capacidade mínima de 0,0001 g e máxima de 220 g.

Sistema de purificação de água por Osmose Reversa modelo OS20 LZ acoplado a um ultra-purificador modelo Master System P&D produzido pela Ind. e Com. Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda.

Banho-maria do evaporador rotativo modelo 034481 produzido pela Quimis Aparelhos Científicos Ltda..

3.2 Materiais, reagentes e soluções

Para a construção das curvas de calibração tanto pelo procedimento proposto quanto pelo procedimento normalizado NBR 15556 foi utilizado padrão multielementar organometálico 23-Element Oil Standard a base de óleo 75, contendo Al, Sb, Ba, B, Cd, Ca, Cr, Cu, Fe, Pb, K, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Si, Ag, Na, Sn, Ti, V e Zn (SPEX CertiPrep., EUA), contendo 100 µg/g para cada elemento. Também foi utilizado Padrão organometálico de Li (1000 µg/g) a base de óleo 75 (SPEX Certi Prep., EUA).

Para as curvas de adição de analito foi elaborada uma solução mãe de Na, K e Ca (100 µg/g) a partir de padrões organometálicos Conostan (USA) com concentrações de 500 ppm para Ca e Mg, e 5000 ppm para Na e K.

Ainda para a elaboração da curva de calibração do procedimento normalizado NBR 15556 foi utilizado óleo mineral puríssimo Ideal, Cicloexano P.A.-A.C.S (Synth, Brasil).

Como solvente e simulacro da matriz no procedimento proposto utilizou-se oleato de metila Dhymers Química Fina produzido no Brasil.

Para limpeza do sistema de introdução da amostra foi utilizada uma solução 1:1 água ultra-pura:etanol. Para elaborar essa solução utilizou-se etanol P.A. 99,8% (Synth, Brasil).

Todas as soluções foram preparadas em frascos de polipropileno descartáveis de 15 ou 50 mL da Jprolab, Corning ou da Global Plast.

3.3 Amostras

Foram obtidas amostras de biodiesel resultantes da transesterificação de diferentes óleos vegetais e gorduras animais pela rota metílica ou etílica conforme descrito na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Amostras de biodiesel de diferente oleaginosas e rotas de síntese.

Amostra	Oleaginosa	Rota
A05	Girassol	Metílica
A18	Desconhecida	Desconhecida
A19	Desconhecida	Desconhecida
A23	Sebo	Metílica
A28	Soja	Metílica
A29	Soja 60% + Sebo 40%	Metílica
A31	Soja 75% + Sebo 25%	Etílica
A32	Soja	Metílica
A34	Algodão	Metílica
A35	Soja + Algodão	Metílica
A36	Óleo Residual	Metílica

As amostras foram cedidas por diferentes fabricantes: Laboratório de Ensaio de Combustíveis (LEC) da UFMG (A05, A18, A19, A23), pela Camera Agroindústria e Comércio Ltda. (A28), Petrobrás Biocombustíveis S/A (A29), Fertibom Indústrias Ltda. (A31), Biominas Engenharia de Energias (A32 e A36), Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE (A34 e A35).

3.4 Limpeza do Material

Todos os tubos e vidrarias foram devidamente descontaminados em banho de HNO_3 10% v/v por no mínimo 24h. Em seguida procedeu-se o enxague com água purificada por 5 vezes e mais 5 vezes com água ultra-purificada.

3.5 Preparo das soluções

3.5.1 Soluções padrão

As soluções padrão para as curvas de calibração foram preparadas pelo método gravimétrico pesando-se a massa apropriada do padrão organometálico multielementar, seguida da pesagem exata de 0,0100 g do padrão organometálico de Li (1000 $\mu\text{g/g}$). A massa foi completada para 10 g com oleato de metila. Procedeu-se a homogeneização por 3 min. em agitador vortex.

As soluções padrão para as curvas de adição foram preparadas a partir de uma solução multielementar de Na, K, Ca e Mg (100 $\mu\text{g/g}$) preparada pela pesagem da massa apropriada dos respectivos padrões organometálicos individuais e a massa completada para 10 g com oleato de metila. A massa adequada para cada ponto foi pesada, seguida da pesagem exata de 0,0100 g do padrão organometálico de Li (1000

$\mu\text{g/g}$) e a massa completada para 10 g com a amostra. Homogeneizou-se por 3 min. em agitador vortex.

3.5.2 Soluções de amostras

As soluções de amostras foram preparadas pesando-se exatamente 0,01 g do padrão organometálico de Li (1000 $\mu\text{g/g}$) e completando-se a massa para 10 g com a própria amostra. Para as amostras em que foi necessário realizar diluição o preparo foi realizado pesando-se 0,0100 g do padrão organometálico de Li (1000 $\mu\text{g/g}$), 0,5000 g de amostra e a massa completada para 10 g com oleato de metila. A homogeneização foi feita em agitador vortex por 3 min..

3.5.3 Quantificação de Na, K e Ca

Para quantificação de Na, K e Ca, foi utilizado o método de calibração externa com padrão interno. Para o preparo da curva analítica feito através da diluição do padrão organometálico multielementar em oleato de metila e o uso de Li como padrão interno, cada ponto da curva foi preparado em triplicata.

Para quantificação das amostras tanto por FAES quanto por FAAS foi realizado o preparo de cinco replicatas.

3.6 Otimização das Condições Instrumentais

Antes e no decorrer das leituras no equipamento sempre foi feito um pequeno ajuste das condições dos fluxos dos gases no comprimento de onda referente a emissão do sódio em 589,98 nm com a solução de limpeza para tentar garantir a reprodutibilidade dos resultados.

Foram registrados cinco espectros de emissão de cada solução analisada, aplicando um tempo de integração de 200 ms. Cada um dos cinco espectros foram obtidos pela média de outros cinco registros.

3.6.1 Estudo de Chama

Foram testadas três diferentes tipos composição de chama através da leitura de uma solução padrão organometálica multielementar de Na, Ca e K 4,00 mg/kg em oleato de metila aquecidas a aproximadamente 50 °C. Devido ao elevado ponto de ebulição do oleato (>280 °C) não há perdas por evaporação. A chama composta de ar/GLP que foi testada no fotômetro de chama adaptado do Laboratório LIMA, a chama composta por ar/Acetileno e a chama de Acetileno/N₂O foram testadas adaptando-se o detector de emissão contínua no Espectrômetro de Absorção Atômica, em que a fibra óptica foi posicionada a 90° em relação a chama. Os espectros de emissão foram registrados em um *notebook* contendo o programa SpectraWiz. Após a análise preliminar foi feita a leitura de um curva analítica nas chamas de ar/GLP e de ar/Acetileno.

3.6.2 Vazão dos Gases

Foi verificado o efeito da vazão dos gases no sinal analítico variando-se os fluxos do gás oxidante ar e de combustível GLP, até que o sinal analítico obtido para uma solução padrão organometálica multielementar de Na, Ca e K 4,00 mg/kg em oleato de metila previamente aquecida, fosse o maior possível dentro da limitação relativa à economia do gás oxidante.

3.6.3 Fluxo da Solução

O fluxo da solução foi otimizado avaliando-se o aumento do sinal analítico com o aumento da taxa de aspiração pelo fotômetro de chama. Foi utilizada uma solução padrão organometálica multielementar de Na, Ca e K 4,00 mg/kg em oleato de metila previamente aquecida e o volume de solução aspirado foi medido com o auxílio de uma proveta.

3.6.4 Efeito da Temperatura da Solução

Foi verificado o efeito da temperatura da solução na taxa de aspiração e no sinal analítico. Para esse experimento foi utilizada uma solução padrão organometálica multielementar de Na, Ca e K 2,00 mg/kg em oleato de metila e a temperatura variou desde a temperatura ambiente até 80 °C em uma taxa de 10 °C. É importante ressaltar que a temperatura de ebulição do oleato de metila é superior a 280 °C, sendo assim, o aquecimento da solução até 80 °C não provoca evaporação do solvente e consequente aumento da concentração dos analitos.

3.7 Validação do procedimento

O procedimento proposto foi parcialmente validado seguindo, quando possível, as instruções do Guia de Validação do Ministério da Agricultura e Pecuária-MAPA.⁸⁷ Foram avaliados os parâmetros como Faixa Linear, Faixa Linear de Trabalho, Sensibilidade, Seletividade, Efeito de Matriz, Veracidade, Precisão, Capacidade de Quantificação, Capacidade de Detecção e Robustez.

Foram registrados cinco espectros de emissão de cada solução analisada, aplicando um tempo de integração de 200 ms, cada um dos cinco espectros foram obtidos pela média de outros cinco registros.

Todas as curvas de calibração e de adição de analito foram ajustadas pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados em planilhas desenvolvidas no programa Excel®, as equações utilizadas nos cálculos encontram-se no Anexo I e foram obtidas no MAPA.⁸⁷ A escolha do MMQP deve-se a heterocedasticidade da distribuição das variâncias dos níveis de concentração da curva de calibração, o que será demonstrado posteriormente.

3.7.1 Linearidade, Faixa Linear de Trabalho e Sensibilidade

Para estudo da Linearidade, Faixa de Trabalho (FT) e Sensibilidade foi construída uma curva de calibração multielementar de Na, Ca e K a partir do padrão organometálico multielementar dissolvido em oleato de metila, utilizando o Li como padrão interno na concentração de 1,00 mg/kg. Para o estudo de Linearidade a curva de calibração abrangeu o intervalo de 0,15 a 50,00 mg/kg. No desenvolvimento do estudo da FT e da sensibilidade foram preparadas soluções padrão multielementares de Na, Ca e K, conforme Tabela 3.3. Foram obtidas curvas de calibração de intensidade de emissão do analito e também da razão analito/padrão interno em função da concentração.

Tabela 3.3. Níveis de concentração da FLT.

Nível de concentração	Analito (mg/kg)	
	Na e K	Ca
1	0,05	0,25
2	0,10	0,50
3	0,25	0,75
4	0,50	1,00
5	0,75	1,50
6	1,00	2,00
7	1,50	2,50
8	2,00	3,00
9	2,50	4,00
10	3,00	-
11	4,00	-

3.7.2 Seletividade e Efeito de Matriz

A avaliação da Seletividade e do Efeito de Matriz do procedimento proposto foi feita a partir da análise de curvas de adição de analito construídas com cada uma das onze amostras que compõe o grupo amostral. Os níveis foram 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/kg preparados a partir de uma solução multielementar de Na, K e Ca elaborada pela diluição de padrões organometálicos individuais desses elementos em oleato de metila e com concentração final de 100,0 mg/kg. Foram obtidas curvas analíticas de intensidade de emissão do analito e também da razão analito/padrão interno em função da concentração do analito adicionado. A sensibilidade das curva de adição foi comparada com a sensibilidade da curva de calibração externa através de testes de hipótese (Teste-F e Teste-t).

Todas as curvas de adição bem como a curva de calibração externa foram construídas com três replicatas independentes de cada nível de concentração.

3.7.3 Veracidade

Devido a inexistência de material de referência certificado e também de matriz branca para biodiesel não foi possível realizar o ensaio para veracidade recomendado pelo MAPA.⁸⁷ No entanto, para essa avaliação foi feita a quantificação de todas as amostras que compõe o grupo pelo procedimento proposto e pelo procedimento normalizado ABNT NBR 15556.⁵⁴ Os resultados para Na, K e Ca obtidos por ambos procedimentos foram comparados através de testes de hipótese (Teste-F e Teste-t).

Para cada amostra foram preparadas cinco replicatas independentes de acordo com a recomendação de preparo descrita em cada um dos procedimentos.

3.7.4 Precisão

A repetibilidade foi avaliada como sendo a dispersão dos resultados obtidos para cada uma das amostras no ensaio de veracidade. Por questões a serem descritas mais adiante, a reprodutibilidade não foi avaliada. Nenhuma das duas observações foram feitas de acordo com as instruções do MAPA.⁸⁷

3.7.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

De acordo com o MAPA⁸⁷ para estimatimar os Limites de Detecção e de Quantificação é necessário plotar numa mesma curva os dados obtidos para três curvas de calibração constuídas em dias diferentes, consecutivos ou não. Neste trabalho foi feita uma estimativa do LD e do LQ a partir da Curva de Limite de Previsão (CLP). A CLP foi obtida pela plotagem dos dados de três curvas de calibração elaboradas e analisadas em dias diferentes. A equações utilizadas na planilha de cálculo encontram-se no Anexo II e foram obtidas segundo Meier.⁸⁸

3.7.6 Robustez

Como foi feita uma otimização das condições do equipamento antes de iniciar o processo de tentativa de validação do mesmo, o ensaio de robustez foi realizado a partir de um planejamento fatorial completo 3^2 , considerando-se apenas pequenas variações positivas (+1) e negativas (-1) dos fluxos do gás oxidante e do combustível conforme experimentos descritos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Descrição dos experimentos no ensaio de robustez.

Experimento	Varição do Oxidante- ar	Varição do Combustível- GLP
1	+1	+1
2	+1	0
3	+1	-1
4	0	+1
5	0	0
6	0	-1
7	-1	+1
8	-1	0
9	-1	-1

A variação descrita como 0 refere-se às condições de fluxo de ar e de GLP obtidas após o ajuste da intensidade de emissão da solução de limpeza para o elemento sódio no comprimento de onda de 589,98 nm. A solução utilizada foi uma solução padrão organometálica multielementar de Na, Ca e K 2,00 mg/kg em oleato de metila aquecida a aproximadamente 50 °C. Foi construída uma superfície de resposta para a variação da intensidade do sinal de emissão do Na, Ca, K e Li bem como das razões Na/Li, K/Li e Ca/Li.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi proposto um procedimento analítico para determinação simultânea de Na, K e Ca empregando da Espectrometria de Emissão em Chama com detector de emissão contínua, utilizando o oleato de metila como simulacro da matriz. A escolha do oleato de metila deve-se ao fato de que a maioria dos biodieseis resultantes do processo de transesterificação das diferentes oleaginosas são constituídos de ésteres metílicos com 18 carbonos compondo a cadeia (Tabela 1.1).

O oleato de metila é um éster de cadeia longa, apresenta propriedades físico-químicas muito próximas às dos biodieseis originados de diferentes oleaginosas mas cuja composição majoritária é de cadeias com 18 carbonos. Esse composto é mencionado na literatura como substância de referência para biodiesel devidos às suas características.⁹⁰ Na Tabela 4.1 tem-se a comparação da densidade específica a 20 °C e da viscosidade cinemática a 40 °C do oleato de metila com as propriedades de diversos biodieseis que compõem o conjunto amostral.

Tabela 4.1. Propriedades do oleato de metila em comparação com as dos biodieseis.

Composto/Biodiesel	Massa específica a 20 °C ± 0,5 (kg/m³)	Viscosidade Cinemática a 40 °C ± 0,1 (mm²/s)
Oleato de Metila	883	4,3
A05	881	4,6
A18	874	4,7
A19	884	4,5
A23	877	4,5
A28	881	4,1
A29	878	4,4
A31	874	4,7
A32	885	4,7
A34	886	5,3
A35	884	4,6
A36	885	4,8

Observa-se na Tabela 4.1 que as propriedades apresentadas são muito próximas às dos biodieseis, exceto para o biodiesel de óleo de algodão em que a viscosidade cinemática é superior às demais, mas está de acordo com a especificação

apresentada na Tabela 1.3. As semelhanças entre as densidades e viscosidades cinemáticas foram os fatores determinantes para escolha do oleato de metila como simulacro da matriz, pois a técnica utilizada para quantificação tem como mecanismo de introdução da amostra a aspiração seguida da formação de aerosol no nebulizador.

No desenvolvimento do procedimento foram avaliadas as interferências, o comportamento dos analitos na chama, a otimização das condições instrumentais e do procedimento, a comparação entre as metodologias de calibração externa com e sem o uso de padrão interno. Posteriormente foi feita a validação parcial do procedimento de acordo com as instruções do MAPA.⁸⁷

4.1 Otimização das Condições Experimentais

4.1.1 O Tipo de Chama

Foram testados três diferentes tipos de composição de chama através da leitura de uma solução padrão organometálica multielementar de Al, Sb, Ba, B, Cd, Ca, Cr, Cu, Fe, Pb, K, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Si, Ag, Na, Sn, Ti, V e Zn 4,00 mg/kg em oleato de metila aquecida a aproximadamente 50 °C. As composições testadas foram ar/GLP, ar/Acetileno e C₂H₂/N₂O.

A chama de ar/GLP tem temperatura de 2000 K, ar/Acetileno de 2450 K e C₂H₂/N₂O de 3100 K, antes da introdução da amostra.⁹² Nas Figuras 4.1 tem-se os espectros de emissão de uma solução multielementar composta pelos 23 elementos citados anteriormente e Li 1,00 mg/kg em oleato de metila a 50 °C, nas diferentes chamas sem a correção a) e após a correção da linha de base b).

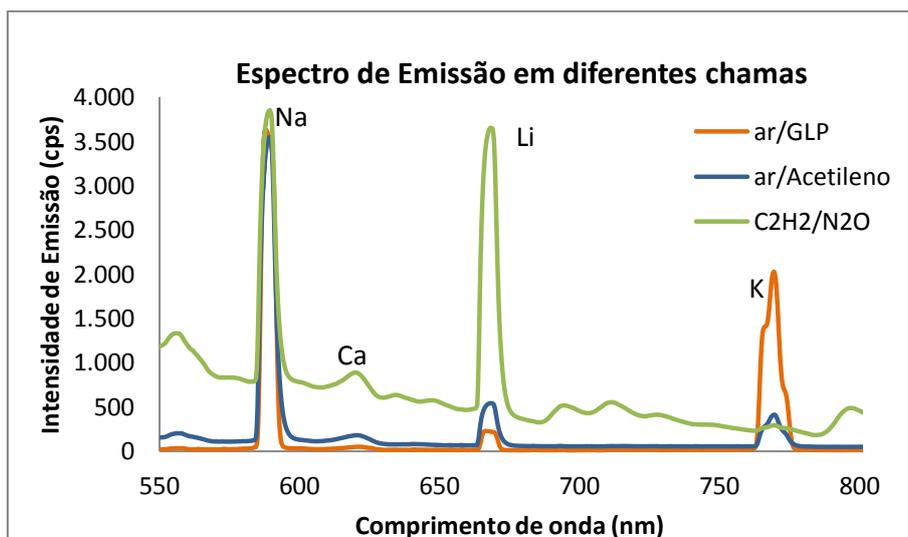


Figura 4.1 a) Espectros de emissão de uma solução multielementar com 23 elementos a 4,0 mg/kg e Li 1,00 mg/kg em oleato de metila a 50 °C em diferentes chamas sem a correção da linha de base.

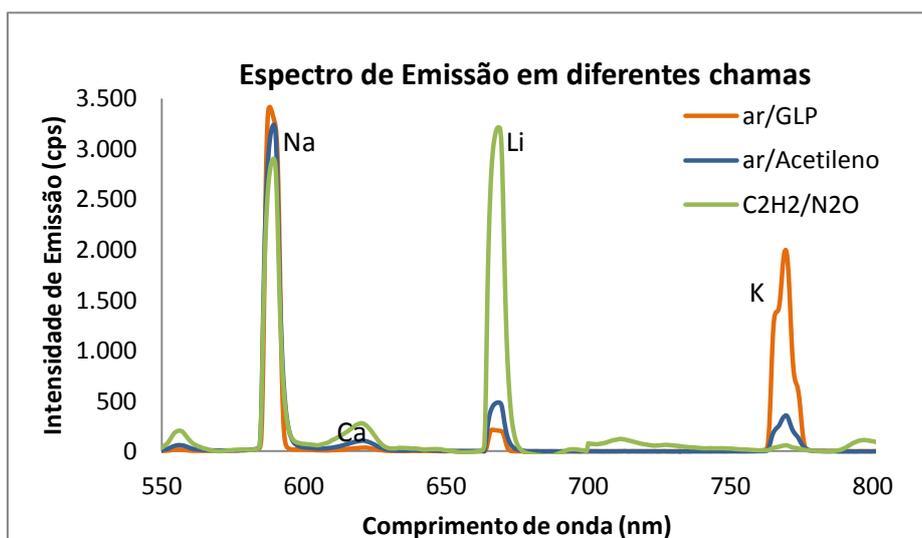


Figura 4.1 b) Espectros de emissão de uma solução multielementar com 23 elementos a 4,0 mg/kg e Li 1,00 mg/kg em oleato de metila a 50 °C em diferentes chamas com a correção da linha de base.

Analisando-se a Figura 4.1 a) observa-se que a radiação de fundo (*background*) é muito mais intensa na chama C_2H_2/N_2O do que nas outras chamas, pois como essa chama é mais quente é possível que outros elementos além de Na, K, Ca e Li estejam emitindo radiação bem como outros radicais originados da matriz. A temperatura dessa chama pode favorecer o processo de atomização de outros elementos que não atomizam em chamas com temperaturas inferiores. Após a correção da linha de base (Figura 4.1 b) observa-se que a intensidade de sinal do Ca é

maior na chama C_2H_2/N_2O , seguida da chama ar/Acetileno e por fim a chama ar/GLP, isso ocorre porque em chama mais frias o Ca tem tendência a formar óxidos refratários o que dificulta o processo de emissão.⁹¹ Observa-se ainda um aumento considerável do sinal do Li, diminuição do sinal do Na e do K com o aumento da temperatura da chama. A diminuição do sinal do sódio e do potássio é justificável pois esses elementos tem tendência a ionizarem em chamas mais quentes, no caso do Li, é possível que não tenha ionizado, pois o esse elemento é menos ionizável que os outros dois. É possível que o K esteja atuando como um supressor de ionização nesse sistema provocando aumento da sensibilidade para Li e diminuindo a ionização do Na fazendo com que o sinal desse elemento permaneça próximo ao sinal observado nas outras chamas. No entanto, como objetivo principal deste trabalho que é a determinação simultânea de Na, K e Ca em biodiesel por análise direta a chama C_2H_2/N_2O , *a priori* não atende às nossas expectativas porque houve perda de sensibilidade para o Na e uma acentuada perda de sensibilidade para o K, suprimindo quase que totalmente o sinal desse elemento.

Contudo, analisando-se o espectro de emissão da solução multielementar na chama C_2H_2/N_2O , apresentado na Figura 4.2, percebe-se uma outra vertente que poderá ser desenvolvida posteriormente.

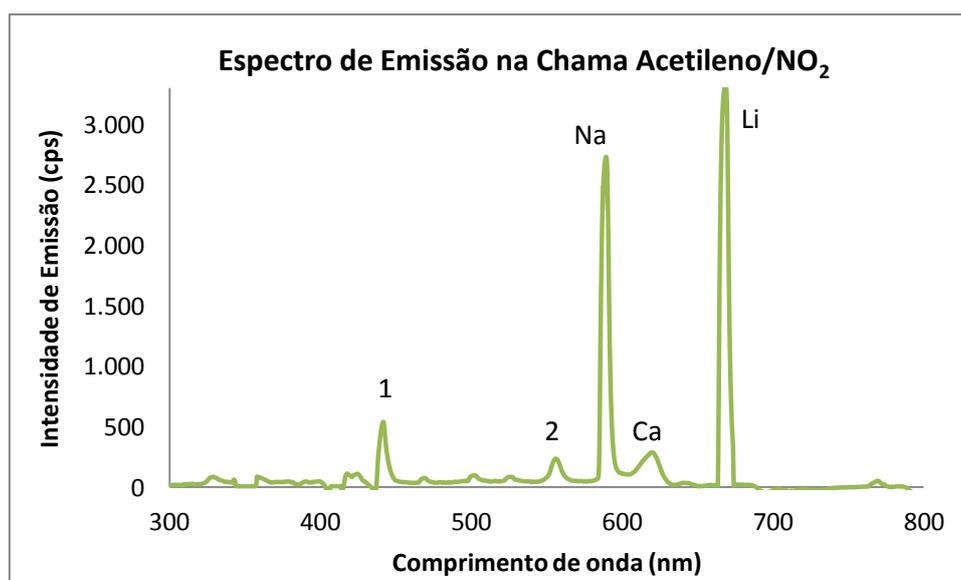


Figura 4.2. Espectro de emissão de uma solução organometálica multielementar com 23 elementos a 4,00 mg/kg e Li 1,00 mg/kg em oleato de metila.

Na Figura 4.2 observa-se além da emissão do Na, Ca e do Li também a emissão do elementos 1 e 2. É possível que o elemento 2 seja o Ba que emite em 554 nm e é quantificável na chama C_2H_2/N_2O , quando presente em concentrações acima de 0,5 mg/kg. Assim, é possível propor um procedimento para determinação simultânea de Na, Ca, Li, 1 e 2 por análise direta de biodiesel, empregando o detector de emissão contínua. Além disso, utilizando o céσιο como supressor de ionização também é possível determinar o K.

Como foi demonstrado não é possível utilizar a chama C_2H_2/N_2O para determinação simultânea de Na, K e Ca em biodiesel. Assim, fez-se a leitura da curva de calibração na chama de ar/GLP e na chama de ar/Acetileno e comparou-se as inclinações para Na, K e Ca conforme mostra Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Comparação da curva de calibração ($y = a + bx$) nas diferentes chamas.

	Analito	ar/GLP		ar/Acetileno	
		$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$
Razão	Na/Li	0,283±0,005	4,0420,012	-0,029±0,004	1,767±0,004
	K/Li	-0,021±0,001	2,054±0,005	-0,0090±0,0004	0,1460±0,0003
	Ca/Li	0,0050±0,0004	0,0409±0,0002	0,0001±0,0005	0,0561±0,0004
Intensidade	Na	64,7±1,1	889,4±0,8	10,0±2,5	813,6±2,5
	K	-7,6±0,2	59,4±1,1	-3,83±0,18	65,83±0,28
	Ca	-0,70±0,09	5,62±0,07	1,0±0,40	26,03±0,23

Analisando-se os dados da Tabela 4.1 observa-se que o uso de uma chama com temperatura mais elevada leva ao ganho de sensibilidade apenas para o Ca. Em relação ao Na e K observa-se uma redução do sinal de 56 e 93%, respectivamente quando são comparadas as curvas da razão analito/padrão interno. Em relação as curvas, avaliando apenas as intensidade de emissão, não é possível fazer comparações devido a uma série de fatores, como por exemplo, o sistema de nebulização dos equipamentos são diferentes, a taxa de aspiração da amostra, o fluxo dos gases, dentre outros. No caso das razões é necessário avaliar com cuidado, pois o comportamento do Li, usado como padrão interno, é diferente nessas chamas, conforme mostrado na Figura 4.1 b) que aponta um ganho de sensibilidade para esse elemento.

O aumento da sensibilidade para o Ca que deve-se provavelmente ao comportamento desse analito na chama, sabe-se que chamas com temperatura mais elevada diminuem a interferência de outros elementos em relação ao Ca. Como o padrão organometálico disponível para construção das curvas contém Al, Si e o P, é possível que o Ca esteja interagindo com esses elementos formando compostos refratários e como a chama ar/GLP tem temperatura mais baixa, ela não consegue desfazer essa interação de maneira tão significativa quanto a chama ar/Acetileno. É importante ressaltar que a concentração de Al e Si nas soluções de calibração são as mesmas do Ca, pois foi utilizado um padrão organometálico constituído de 23 elementos dentre eles os elementos mencionados.

No caso do sódio, a perda de sensibilidade pode ser devido a que em chamas mais quentes, como a ar/Acetileno, a taxa de ionização desse elemento é cerca de 20% maior do que em chamas frias como a de ar/GLP. Em relação ao K observa-se a perda de sensibilidade pois esse elemento ioniza cerca de 40% a mais em chamas como ar/Acetileno.⁹² Não foi utilizado o Cs como supressor de ionização porque não tínhamos disponível esse elemento na forma organometálica para condução dos estudos.

4.1.2 A Vazão dos Gases e a Taxa de Aspiração da Solução

O fluxo da solução foi maximizado avaliando-se o aumento do sinal analítico com o aumento da taxa de aspiração pelo fotômetro de chama. Foi utilizada uma solução padrão organometálica multielementar de Na, Ca e K 4,00 mg/kg em oleato de metila previamente aquecida.

O efeito da vazão dos gases no sinal analítico foi verificado variando-se os fluxos do gás oxidante ar e de combustível GLP até que o sinal analítico, obtido para uma solução padrão organometálica multielementar, fosse o maior possível.

A vazão definida para os gases foi de 0,3 mL/min para o combustível e de 3 mL/min para o ar. Observou-se que, quanto maior a vazão dos gases, maior o sinal analítico. Isso se deve principalmente ao fato de que uma vazão maior dos gases aumenta a taxa de aspiração, melhora o processo de nebulização da amostra e uma quantidade maior de analito tem acesso a chama. Outro ponto a ser considerado é que quanto maior a razão ar/combustível mais efetivo é o processo de combustão e maior a temperatura da chama. Trabalhou-se com uma vazão máxima de 3,5 mL/min de ar porque com o aumento da razão ar/combustível observa-se a extinção da chama.

A taxa de aspiração da solução foi regulada de modo a que o nível de maior concentração da curva de calibração (4,00 mg/kg) obtivesse o maior sinal possível. O comprimento de onda de referência foi o Na (589,98 nm), pois o sódio é o analito que apresenta maior sensibilidade dentre os elementos estudados. O valor máximo de sinal de intensidade que o aparelho fornece está em torno de 4100 cps. Assim, regulou-se a taxa de aspiração de modo que o sinal do Na para o nível 4,00 mg/kg estivesse em torno de 3600-3800 cps, admitindo-se uma margem de segurança devido às oscilações do próprio equipamento. Sabe-se que quanto maior a taxa de aspiração da solução maior o sinal analítico, pois uma quantidade maior de analito chega ao queimador.

4.2 Otimização Experimental

4.2.1 Interferências

A Espectrometria de Emissão em Chama é uma técnica praticamente livre de interferências espectrais e não-espectrais, pois devido a baixa temperatura da chama apenas algumas linhas espectrais de emissão são obtidas e em chamas como ar/GLP, a taxa de ionização é muito menor do que em outros tipos de chama. Sabe-se que o grau de ionização dos metais alcalinos aumenta com o aumento da temperatura da chama.⁹² Contudo, no desenvolvimento deste trabalho foram indentificadas

algumas interferências espectrais e não-espectrais. Interferências comuns em FAES são as interferências causadas pela matriz, pela ionização do analito, pela auto-absorção e pela emissão de fundo.⁹²

A auto-absorção é um fenômeno em que fótons das transições de ressonância inicialmente emitidos por átomos no estado excitado, são reabsorvidos por átomos no estado fundamental. Esse fenômeno ocorre principalmente quando se tem analitos em alta concentração e é um dos principais fatores que limitam a faixa linear da curva de calibração em FAES em concentrações relativamente baixas.⁹²

Neste trabalho as interferências causadas pela matriz, pela auto-absorção e pela ionização do analito foram investigadas na etapa de validação do procedimento e serão discutidas posteriormente.

O espectro de emissão em chama contém vários picos de emissão molecular de espécies tais como CH, CN, C₂ e OH sobrepostas em um amplo *background* sem forma definida.⁹² Essas emissões em geral, coincidem com o comprimento de onda de emissão dos analitos de interesse, provocando aumento do sinal analítico. Devido à complexidade da matriz orgânica de biodiesel foi necessário fazer a correção da linha de base. A Figura 4.3 mostra um espectro amplificado na região de interesse sem correção e com correção da linha de base para uma solução multielementar 1,00 mg/kg de Na, K, Ca e Li.

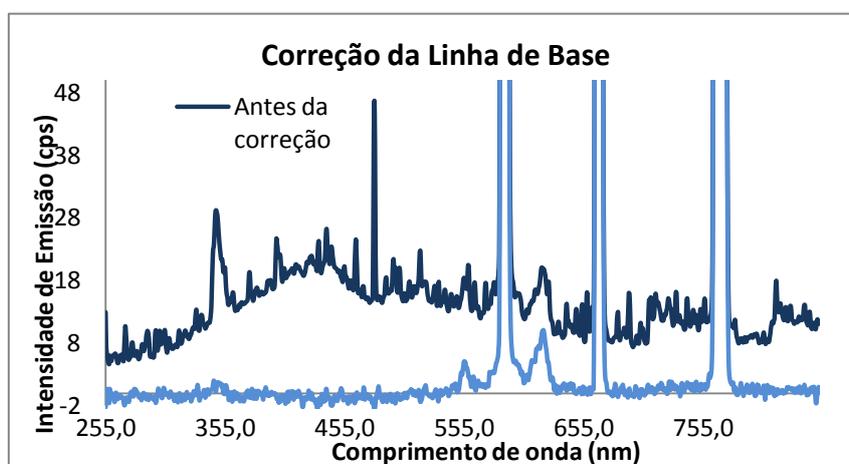


Figura 4.3. Espectro de Emissão de uma solução 1,00 mg/kg de Na, K, Ca e Li. Em destaque a correção da linha de base.

No caso do procedimento proposto foram escolhidas linhas de emissão para os elementos Na ($\lambda = 589$ nm), Li ($\lambda = 668,5$ nm), K ($\lambda = 769,9$ nm). Para o Ca, a principal linha de emissão é em 423 nm, mas a linha mais sensível é em 620,5 nm atribuída a emissão CaOH^+ . A escolha dessas linhas foram baseadas na ausência de interferência espectral e na sensibilidade. A Figura 4.4 mostra um espectro de emissão obtido para uma solução multielementar com 23 elementos numa concentração de 4,00 mg/kg e Li 1,00 mg/kg em oleato de metila.

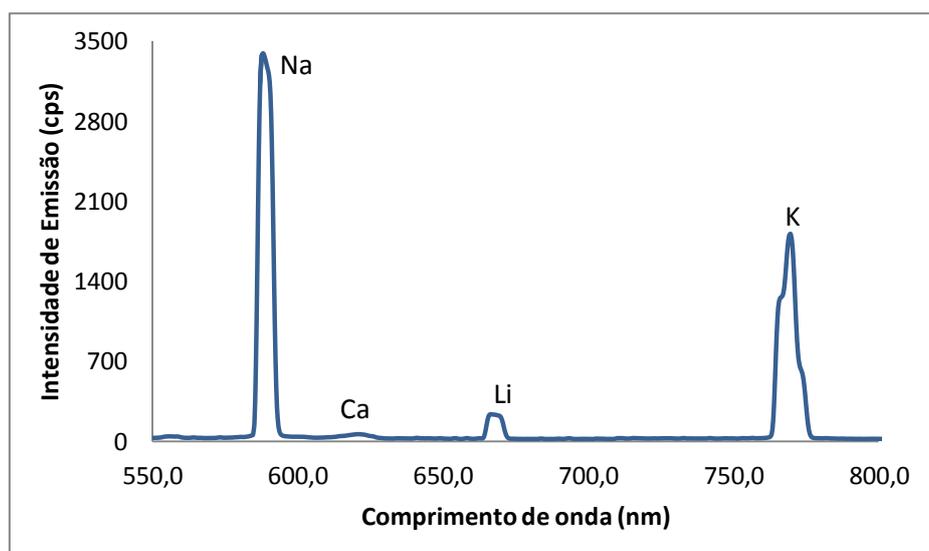


Figura 4.4. Espectro de Emissão para uma solução multielementar de de Na, Ca, K 4,00 mg/kg e Li 1,00 mg/kg em oleato de metila.

Analisando-se a Figura 4.4 observa-se nesse espectro de emissão a diferença de sensibilidade para o Na, K e Ca que encontram-se na mesma concentração. Para o Na e o K a sensibilidade é maior quando compara-se ao sinal do Ca. Conforme descrito anteriormente isso se deve à temperatura da chama. Outra observação é a forma dos picos, o pico do Na é constituído de um duplete referente à sobreposição de duas linhas de emissão em 589,0 e 589,6 nm, o pico do K também apresenta um ombro devido à intensidade de emissão em 766,5 e 769,9 nm.

As interferências espectrais são aquelas em que a linha de absorção ou emissão de um determinado elemento interfere na linha do outro provocando aumento ou redução da intensidade. Esse tipo de interferência é mais comum nas técnicas de emissão, pois os espectros de emissão são muito mais complexos que os espectros de absorção devido a que no início da emissão são observadas um grande

número de alterações nos níveis de energia tanto para os estados intermediários bem como para o estado fundamental.⁹² De acordo com o espectro apresentado na Figura 4.4, aparentemente não se observa qualquer tipo de interferência espectral entre as linhas de emissão dos analitos. No entanto, fazendo-se uma análise mais minuciosa do espectro foi observado que com o aumento da concentração de sódio na solução ocorre sobreposição do sinal de emissão do sódio em relação ao sinal de emissão do cálcio, assim não é possível fazer uma correção perfeita para a linha de base do Ca. A Figura 4.5 mostra o aumento da interferência espectral da emissão do Na no sinal de emissão do Ca com o aumento da concentração dos analitos em soluções multielementares de Na, K, Ca e Li em oleato de metila, em destaque a região de interferência.

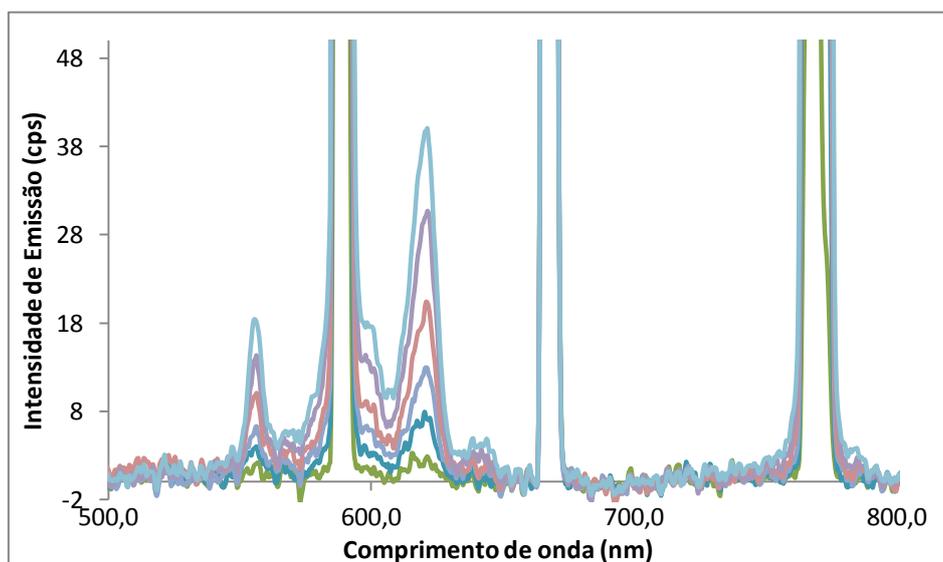


Figura 4.5. Aumento da interferência espectral da emissão do Na em relação ao Ca com o aumento da concentração.

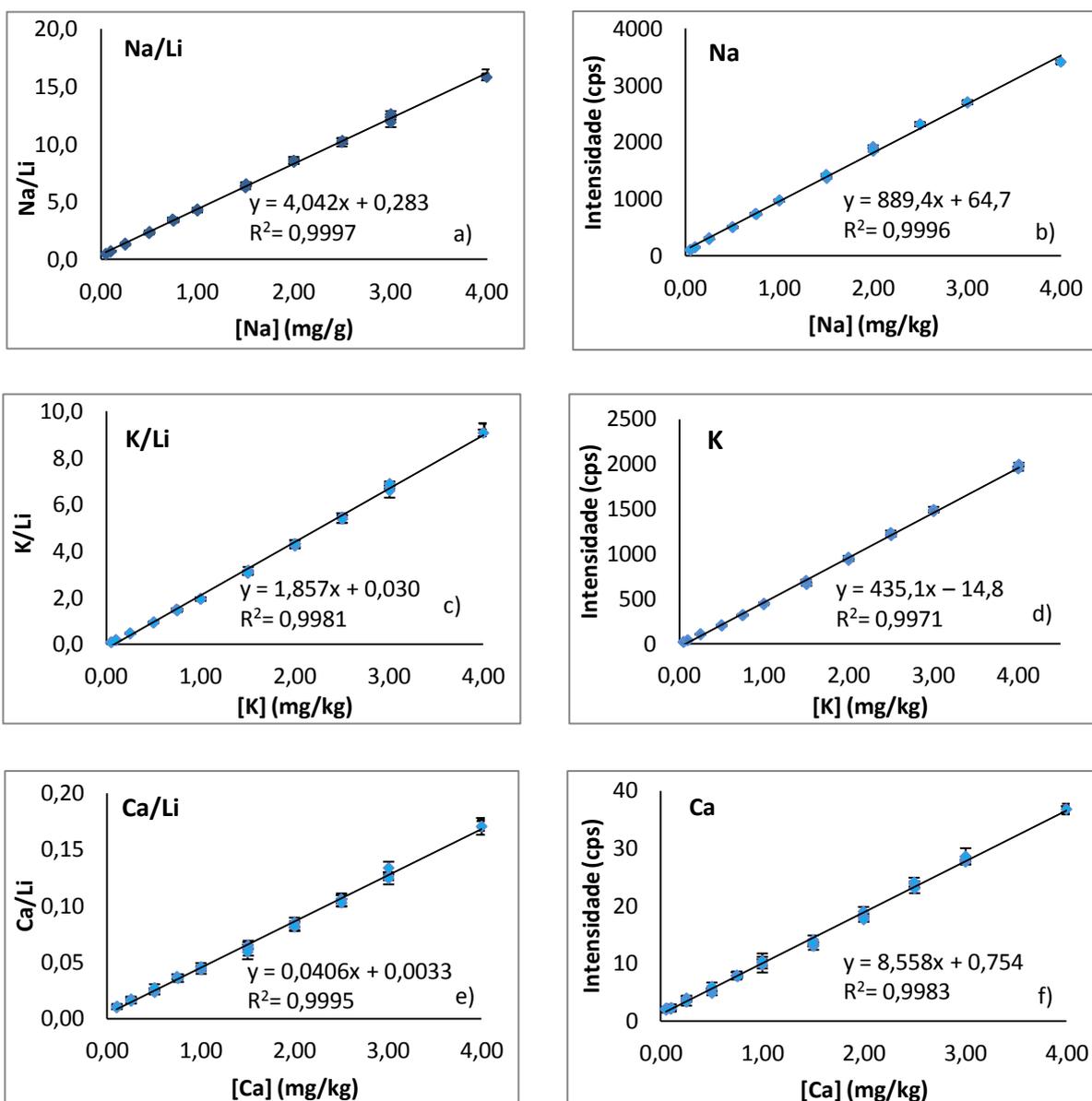
Analisando-se a Figura 4.5 observa-se que com o aumento da concentração observa-se o aparecimento de um pico em torno de 555,0 nm e de um ombro em aproximadamente 600,0 nm. No entanto, devido à intensidade da emissão do Na e também do Ca será demonstrado posteriormente que essas emissões são significativas e comprometem a quantificação do Ca quando a concentração do Na é elevada (acima de 4,00 mg/kg), sendo necessária a diluição da amostra no próprio oleato de metila, para quantificar esses analitos. É importante ressaltar que a grande maioria das amostras não apresentam concentrações tão elevadas.

4.2.2 O Uso do Li como Padrão Interno

Soluções de calibração e amostras devem apresentar semelhança em propriedades como viscosidade, densidade, tensão superficial e pressão de vapor,⁶⁷ para que não haja diferenças nas taxas de aspiração e de nebulização entre as soluções das amostras e as soluções de calibração, essas diferenças podem resultar em erros sistemáticos, tais como aumento ou redução do sinal analítico.⁷³ O uso de padrão interno pode corrigir essas diferenças.

No método do padrão interno, uma quantidade conhecida da espécie que atua como referência é adicionada a todas as amostras, padrões e brancos para compensar certos tipos de erros se estes influenciam tanto o analito como a espécie de referência na mesma proporção, como por exemplo, temperatura, taxa de aspiração da amostra e nebulização. Para a compensação ocorrer, deve-se escolher uma espécie de referência que tenha propriedades físicas e químicas similares àquelas do analito. O sinal de resposta é a razão entre o sinal do analito e o da espécie de referência, a curva analítica é preparada de maneira usual na qual o eixo y é a razão entre as respostas e o eixo x, a concentração do analito nos padrões.⁹¹

A escolha do Li como padrão interno é justificada pois esse elemento é da mesma família dos analitos Na e K e amostras de biodiesel não contém, ou contém em quantidades insignificantes esse elemento, outro fator é que o Li sofre menos efeitos de ionização na chama utilizada. As Figuras 4.6 apresentam curvas de calibração para Na, K e Ca desenvolvidas para o procedimento proposto em que a), c) e e) apresentam as curvas da razão do sinal analítico considerado o uso do padrão interno e b), d) e f) corresponde às curvas de intensidade.



Figuras 4.6. Curvas de calibração para Na, K e Ca. a), c) e e) com o uso de padrão interno, b), d) e f) sem considerar o padrão interno.

De acordo com os Figuras 4.6, para as curvas apresentadas, o uso de padrão interno não se mostra necessário, pois o ajustes dos dados de calibração mostrou linearidade, com coeficiente de determinação maior que 0,99 para todas as curvas apresentadas, e a repetitividade da calibração mostrou-se melhor para as curvas de intensidade comparadas as curvas em termos das razões. No entanto, procedeu-se a validação utilizando o padrão interno para verificar outros fatores que serão discutidos posteriormente.

4.2.3 O Efeito da Temperatura da Solução

Foi verificado o efeito da temperatura da solução na taxa de aspiração e no sinal analítico. Para esse experimento foi utilizada uma solução padrão organometálica multielementar de Na, Ca e K 2,00 mg/kg em oleato de metila e a temperatura variou desde a temperatura ambiente até 80 °C numa taxa de 10 °C.

A viscosidade é um parâmetro físico-químico que, para a maioria dos fluidos, diminui com o aumento da temperatura. É relatado na literatura o efeito da temperatura na viscosidade, a Figura 4.7 mostra a variação da viscosidade absoluta com a temperatura para diferentes ésteres metílicos, inclusive para o oleato de metila.⁹⁴

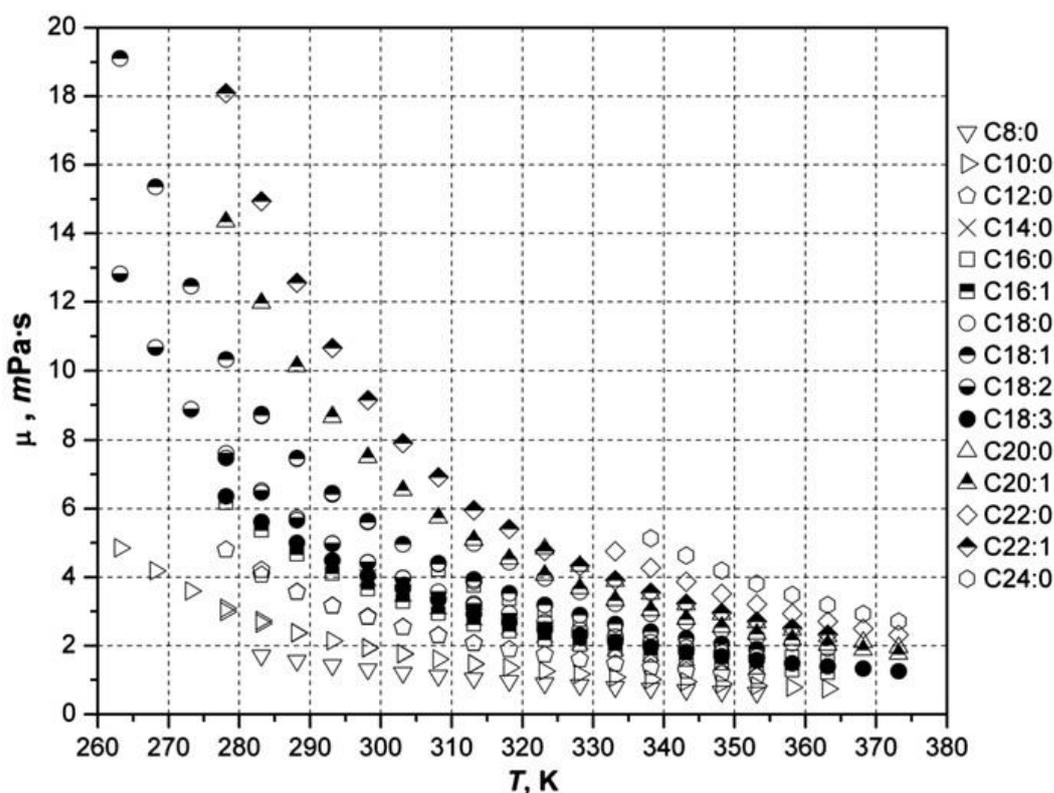
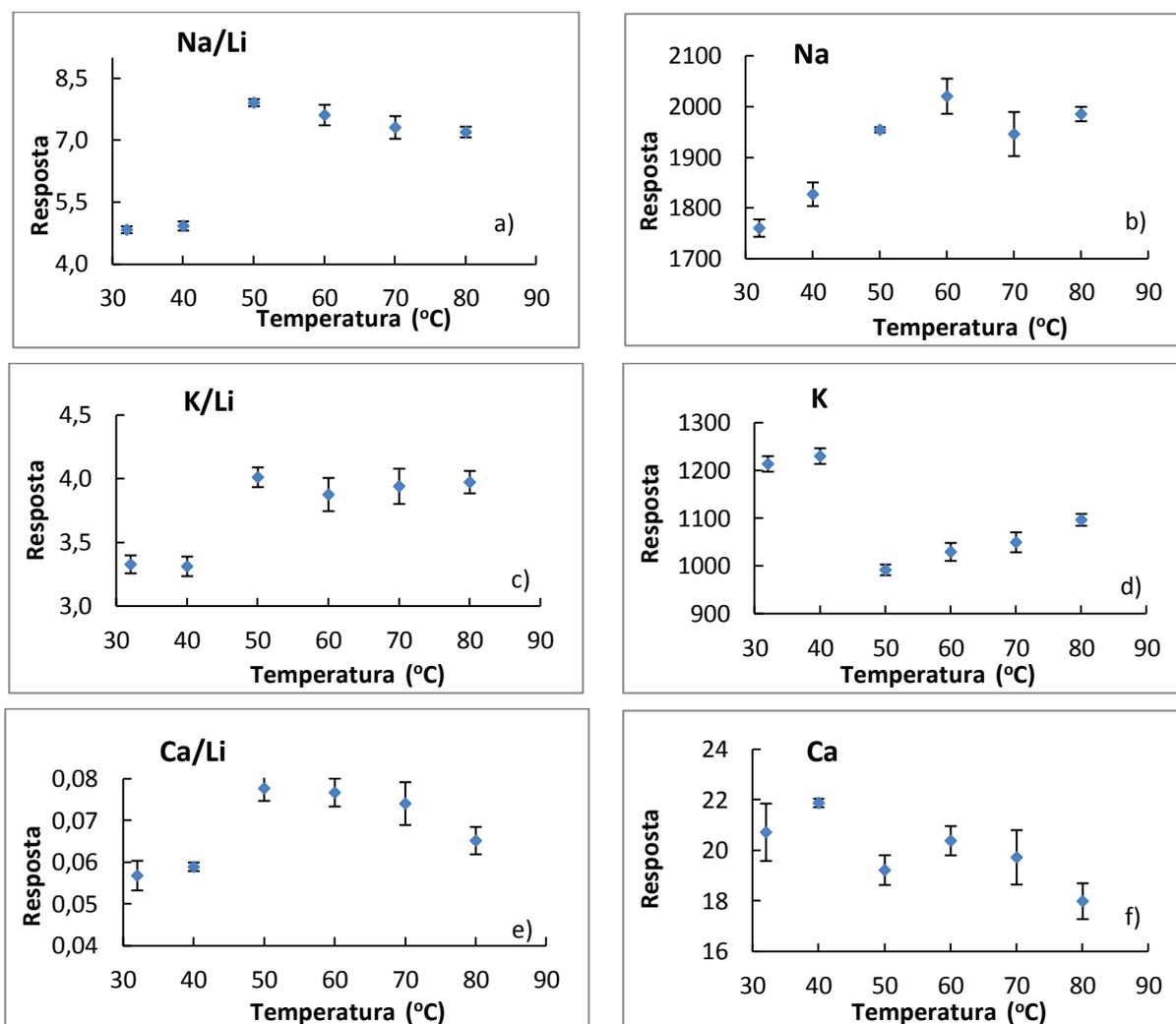


Figura 4.7. Efeito da temperatura na viscosidade absoluta de ésteres metílicos.⁹⁴

No caso do biodiesel, que é uma mistura dos ésteres mostrados na Figura 4.7, e que apresenta viscosidade relativamente alta, uma estratégia que possibilitasse a diminuição da mesma poderia melhorar o procedimento proposto no sentido de aumentar a taxa de aspiração da solução pelo aumento da fluidez da mesma. Com isso,

haveria um aumento da sensibilidade do procedimento. Para isso fez-se o estudo do efeito da temperatura da solução no sinal analítico. As Figuras 4.8 a), c) e e) mostram o efeito da temperatura na razão analito/Li, enquanto que nos Figuras 4.8 b), d) e f) mostram esse efeito na intensidade de emissão do analito.



Figuras 4.8. Variação da razão da emissão analito/Li com a temperatura. a) Na/Li, c) K/Li, e) Ca/Li. E variação da intensidade de emissão com a temperatura. b) Na, d) K, f) Ca.

Analisando-se as Figuras 4.8 a), d) e e) observa-se que a 50 °C tem-se a razão da emissão do analito/Li maximizada para os três elementos. Nas Figuras 4.7 b), d) e f) observa-se um aumento progressivo até 60 °C na intensidade de emissão do Na, enquanto que para K e Ca a 40 °C tem-se o maior valor de intensidade de sinal. Analisando-se os gráficos que apresentam a intensidade de emissão, nota-se que o comportamento do Na é completamente diferente do comportamento do K e do Ca,

não sendo possível encontrar uma explicação para o comportamento do Na nesse experimento.

Conforme discutido anteriormente quanto mais amostra chega ao queimador espera-se que maior seja o sinal analítico. Assim, além do efeito da temperatura sobre o sinal analítico também foi avaliado o efeito da temperatura na taxa de aspiração da amostra. O resultado da observação é apresentado na Figura 4.9.

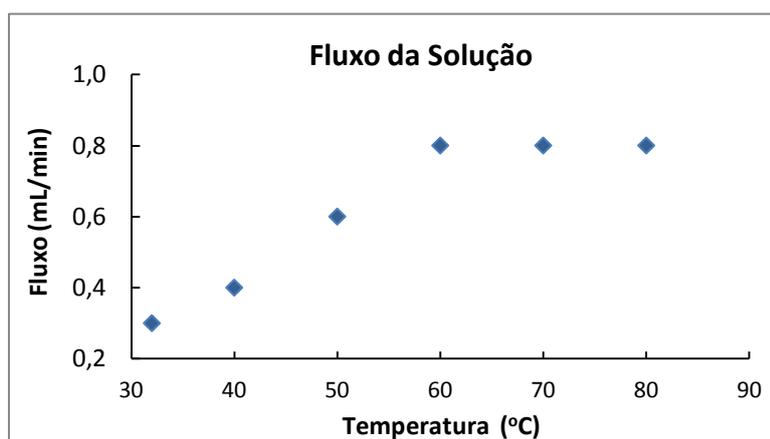


Figura 4.9. Efeito da temperatura na taxa de aspiração da solução.

De acordo com a Figura 4.9 o fluxo de amostra aumenta progressivamente até 60 °C e em seguida não há variação significativa. Conforme mostrado na Figura 4.7 a variação da viscosidade do oleato de metila com a temperatura apresenta um decaimento significativo até cerca de 60 °C e a partir dessa temperatura a variação torna-se praticamente insignificante, esse fator pode justificar o comportamento da taxa de aspiração mostrado na Figura 4.9, é possível que como a diminuição da viscosidade é menos expressiva a partir de 60 °C o aumento da taxa de aspiração também o seja uma vez que essas variáveis são intimamente relacionadas. O comportamento da viscosidade da solução explica os resultados apresentados nas Figuras 4.8, em que observa-se um aumento significativo do sinal analítico devido à diminuição da viscosidade que provoca aumento da fluidez da solução e consequentemente aumento do sinal analítico.

Escolheu-se como temperatura para aquecimento das soluções, como sendo de aproximadamente 50 °C, antes da introdução no equipamento por dois

motivos: o primeiro é devido ao ganho de sinal analítico proporcionado pela diminuição da viscosidade, o segundo é devido a que acima de 50 °C a amostra pode sofrer decomposição.^{52,54}

4.3 Validação do Procedimento Analítico

De acordo com o MAPA⁸⁷ no processo de desenvolvimento de um procedimento analítico os parâmetros e os critérios de validação aplicáveis às determinações dos analitos devem levar em consideração o nível de concentração de interesse (limite máximo permitido, teor máximo de contaminante, ou limite mínimo de desempenho requerido, ou limite de quantificação) no qual alguma decisão será tomada. Para substâncias permitidas, devem ser levados em consideração os Limites Máximos Permitidos (LMR). Para analitos banidos ou proibidos, deve-se considerar o Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) estabelecido pelas normativas específicas.⁸⁷

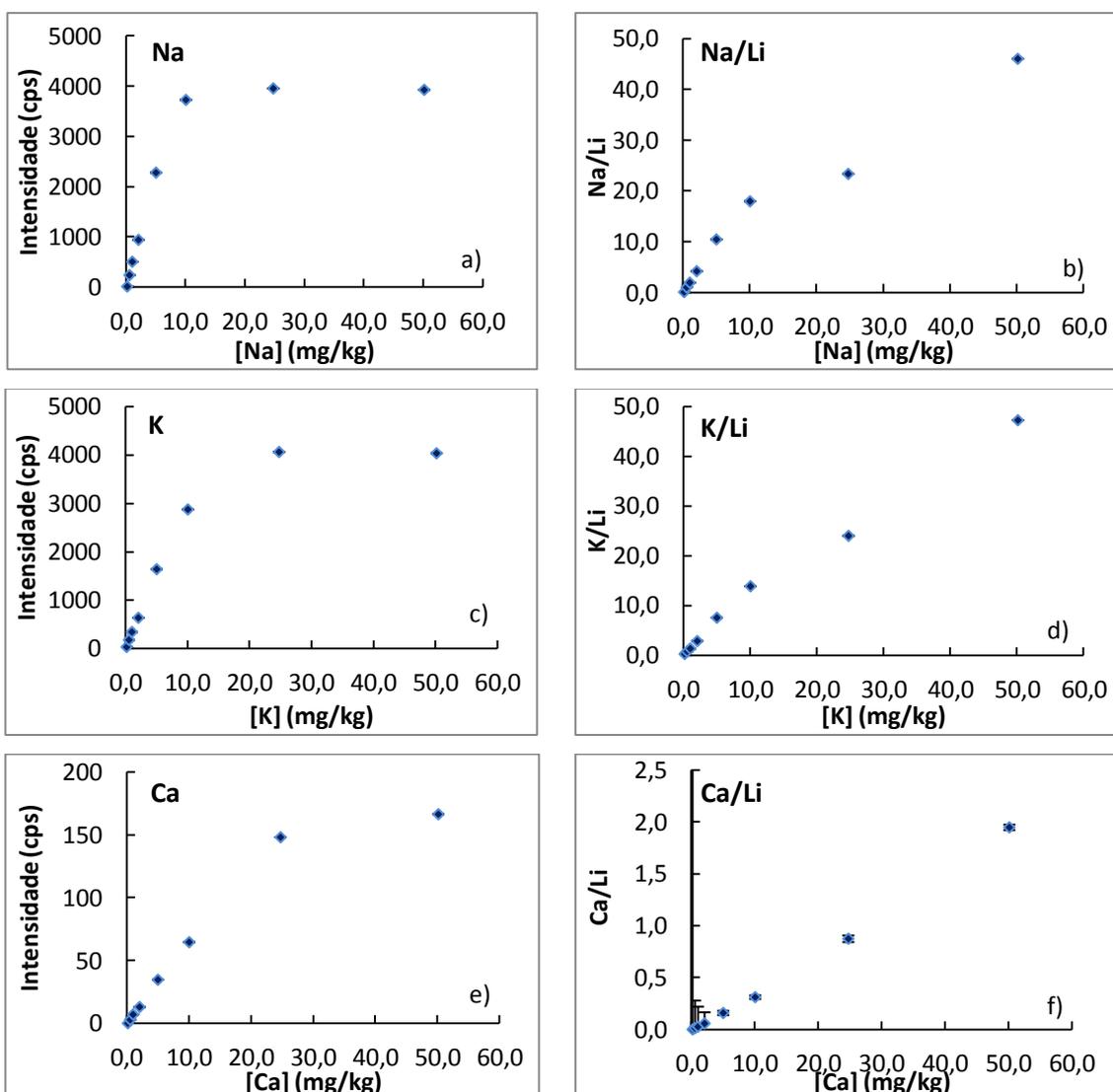
No caso de se considerar o LMR, esse valor deve compor o nível correspondente à metade da faixa linear de trabalho, pois esta região está menos suscetível a erros significantes do que as extremidades da curva. Quando se considera o LMDR o desenvolvimento do procedimento deve se basear em obter a maior sensibilidade possível para que se tenha o LMDR dentro da faixa linear de trabalho.

4.3.1 Linearidade, Faixa Linear de Trabalho e Sensibilidade

Das definições do Manual de Validação tem-se que linearidade é a capacidade do procedimento produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A escolha desse intervalo para aplicação no procedimento é denominado Faixa de Trabalho.⁸⁷

Foi avaliada a Faixa Linear do procedimento proposto através da elaboração de curvas de calibração para Na, K e Ca em concentrações de até 50,0

mg/kg. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.10 a), c) e e) para intensidade de emissão e nas Figuras 4.10 b), d) e f) para a razão analito/Li.



Figuras 4.10. Avaliação da linearidade para concentrações do analito de até 50,00 mg/kg. Intensidades de emissão a) Na, c) K e e) Ca. Razão analito/padrão interno b) Na/Li, d) K/Li e f) Ca/Li.

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 4.10 observa-se que para o sódio e o potássio tem-se uma faixa linear até 10,0 mg/kg, avaliando-se tanto a curva para intensidade *versus* concentração, quanto a curva da razão analito/Li *versus* concentração. Para o cálcio observa-se que na curva de intensidade obtém-se uma faixa linear até 25,0 mg/kg e na curva da razão Ca/Li a faixa linear até 50,0 mg/kg foi encontrada. A faixa linear para Na e K é limitada até 10 mg/Kg devido provavelmente

ao fenômeno da auto-absorção. Para o Ca, devido a baixa sensibilidade para esse elemento em comparação com o Na e o K, a faixa linear apresentada para a curva de intensidade de emissão foi de até 25,0 mg/kg.

Analisando os Gráficos que apresentam as razões entre os sinais de emissão dos analitos e o sinal do padrão interno, observa-se que para Na e K há uma faixa linear até 10,0 mg/kg. É possível que Na e K apresente uma faixa linear com outra sensibilidade entre 25,0 e 50,0 mg/kg, mas para avaliar esse fato, seria necessário elaborar pontos intermediários dentro desse intervalo, mas esse fato não foi verificado pois a faixa apresentada até 10,0 mg/kg atende aos objetivos desse trabalho, como será discutido posteriormente. Para a razão Ca/Li a faixa linear apresentada chega a 50,0 mg/kg. A faixa linear apresentada para a razão Ca/Li é maior devido a baixa sensibilidade desse elemento, em comparação com Na e K, e também porque o Li está corrigindo os erros devido a variações nas taxas de nebulização.

Na legislação brasileira indica-se que o LMR para Na + K é de 5,00 mg/kg e para Ca + Mg também de 5,0 mg/kg (Tabela 1.2). No entanto como a maioria das amostras recebidas de unidades produtoras de biodiesel apresentam concentrações desses analitos menores que 1,0 mg/kg, optou-se por construir a curva analítica até 4,0 mg/kg para cada um dos analitos avaliados para estimar com a maior segurança possível as concentrações mais baixas. O nível 5,0 mg/kg não foi escolhido como nível de maior concentração, pois esse ponto não se ajustava de forma satisfatória à reta de calibração. Assim, não seguiu-se estritamente as instruções do Manual de Validação que recomenda nesse caso que o nível de decisão (5,0 mg/kg) se encontre preferencialmente na região central da curva de calibração. Vale lembrar que a presença de Na e K determinada pelo tipo de catalisador utilizado na síntese (metóxido de sódio ou metóxido de potássio). Assim, apenas um desses analitos é encontrado em concentração majoritária nas amostras. Com isso, pode-se admitir que o nível de decisão seja de 5,0 mg/kg para um dos analitos e não para a soma das concentrações dos mesmos.

Ainda segundo o MAPA⁸⁷ os critérios para planejamento de elaboração da curva de calibração devem ser os seguintes:

- O número de níveis de concentração das soluções padrão de calibração, designado por I, deve ser no mínimo cinco.
- Cada i-ésimo nível de concentração deve ter sua solução preparada em no mínimo três replicatas independentes, J.
- Cada uma das soluções de calibração deve ser analisada no instrumento de medição um número L de vezes.

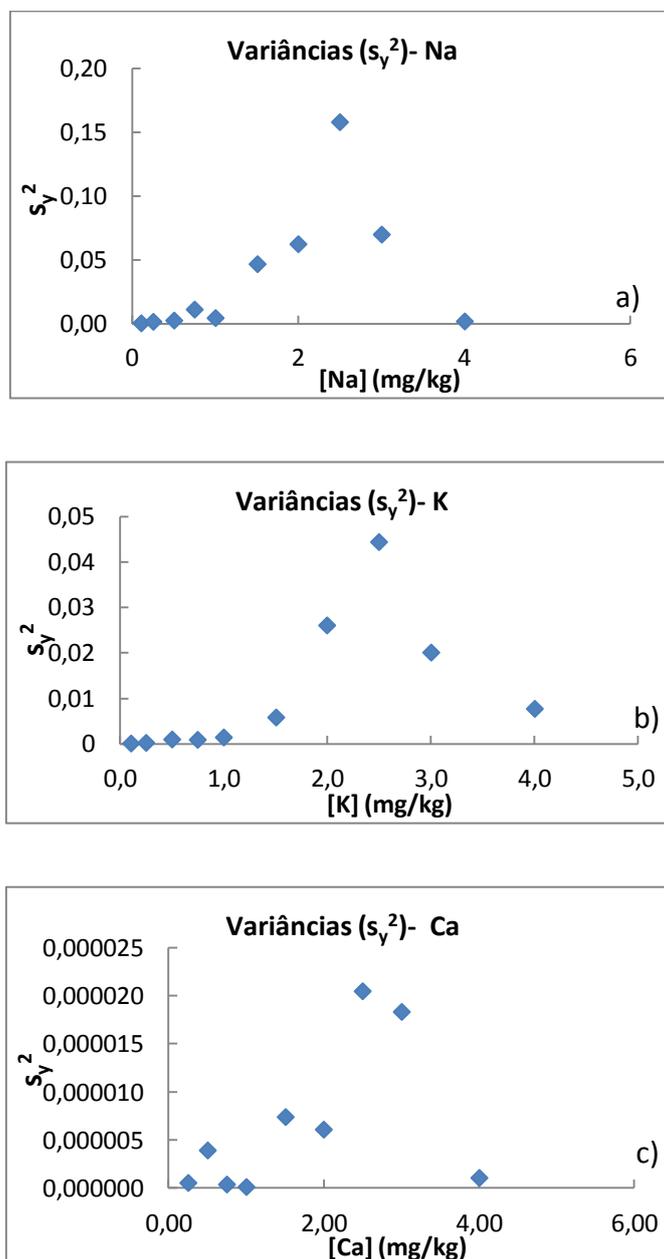
Tem-se então um número de respostas instrumentais $N_y = I \times J \times L$. O número de respostas instrumentais deve ser maior ou igual a 30. Com essas instruções definiu-se então FLT para os analitos conforme mostra Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Níveis de concentração da FLT.

Nível de concentração	Analito	
	Na e K	Ca
1	0,05	0,25
2	0,10	0,50
3	0,25	0,75
4	0,50	1,00
5	0,75	1,50
6	1,00	2,00
7	1,50	2,50
8	2,00	3,00
9	2,50	4,00
10	3,00	-
11	4,00	-

Os dados da calibração foram tratados pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados Relativo (MMQPR), cujas equações encontram-se no Anexo I. O tratamento dos dados pelo MMQP é sempre correta e recomendada, eliminando-se a necessidade de se fazer o teste de homocedasticidade da curva de calibração.⁸⁶ As planilhas desenvolvidas para efetuar o ajuste dos dados das curvas de calibração pelo MMQPR fornecem as variâncias das respostas instrumentais (s_y^2) de cada nível de concentração e a distribuição dos resíduos normalizados dos níveis de concentração

para verificar a ocorrência de heterocedasticidade. Nas Figuras 4.11 a), b) e c) tem-se exemplos da distribuição das variâncias das respostas instrumentais (s_y^2) de cada nível de concentração para Na, K e Ca respectivamente, obtidas para curvas de calibração no desenvolvimento do procedimento.

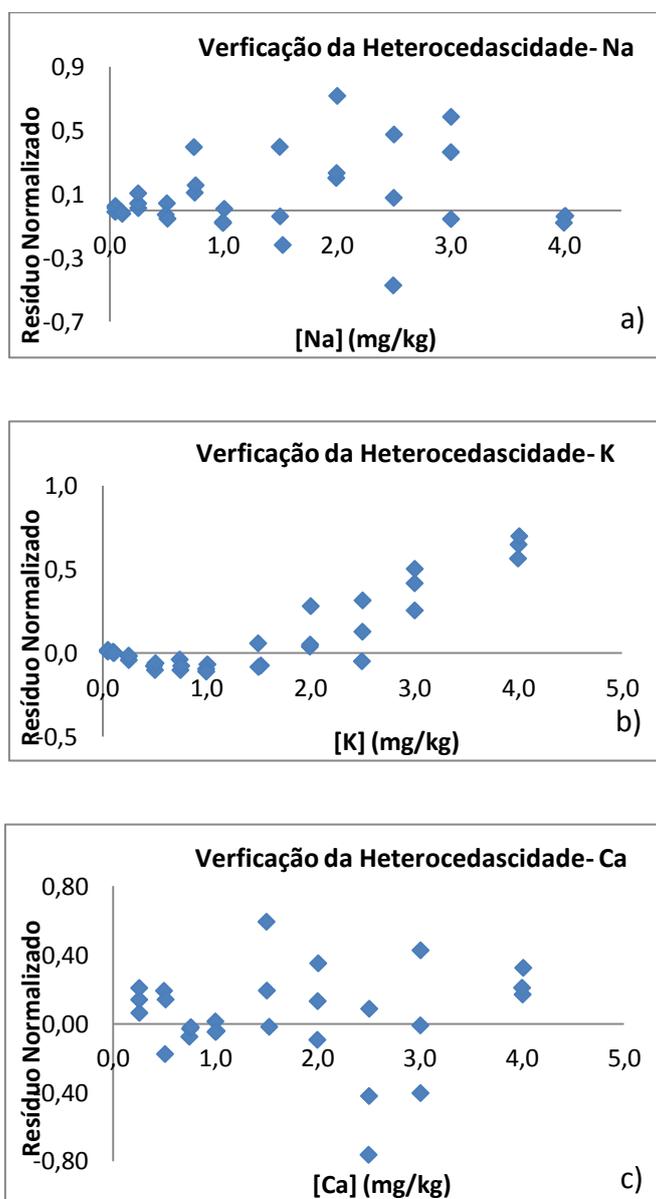


Figuras 4.11. Distribuição das variâncias das respostas instrumentais (y) com o nível de concentração. a) Na, b) K e c) Ca.

Pode-se observar que as variâncias são maiores no centro em comparação com as extremidades, sendo que para a maioria das técnicas observa-se o contrário. É

possível que, nesse caso, as variâncias são maiores no centro por questões referentes ao preparo das soluções uma vez que o procedimento de preparo envolve o método gravimétrico e não foi possível estimar a incerteza dos níveis (s_x^2) de calibração em relação à concentração dos analitos.

Nas Figuras 4.12 a), b) e c) tem-se exemplos da distribuição dos resíduos normalizados para verificação da heterocedasticidade obtidos para as mesmas curvas de calibração cujos desvios padrão foram apresentados nas Figuras 4.11.



Figuras 4.12. Distribuição dos resíduos normalizados com o nível de concentração. a) Na, b) K e c) Ca.

Nas Figuras 4.11 e 4.12. tem-se o comportamento das variâncias e da distribuição dos resíduos normalizados com o nível de concentração, observa-se que as repetitividades são diferentes para os diversos níveis e a distribuição dos resíduos não se apresenta de forma aleatória. Assim, conclui-se que há heterocedasticidade e que os dados da curva de calibração devem ser tratados pelo MMQP. Uma descrição bastante minuciosa de como interpretar os gráficos apresentados encontrasse no Manual.⁸⁷

A sensibilidade é determinada pela inclinação da curva de calibração, no caso de uma reta é o coeficiente angular.⁸⁷ Ocorreram alguns problemas na definição da sensibilidade para os analitos. Mesmo fazendo-se o ajuste das condições de chama no equipamento, antes de se iniciar as atividades diárias, não foi possível obter a reprodutibilidade da curva. Mesmo quando se fez leituras consecutivas da mesma curva analítica obteve-se resultados estatisticamente diferentes, no caso do sódio os valores apresentaram-se bastante discrepantes. A Tabela 4.4 apresenta o coeficiente angular com seu respectivo desvio para três curvas elaboradas e analisadas em diferentes momentos de um dia e também em dias diferentes considerando a razão analito/Li.

Tabela 4.4. Inclinação obtida para diferentes curvas razão analito/Li.

Curva ^a	Na	K	Ca
	$b \pm s_b$	$b \pm s_b$	$b \pm s_b$
Curva 1	$3,67 \pm 0,01$	$1,85 \pm 0,01$	$0,0447 \pm 0,0002$
	$3,28 \pm 0,01$	$1,90 \pm 0,01$	$0,0406 \pm 0,0002$
	$4,04 \pm 0,01$	$2,05 \pm 0,01$	$0,0409 \pm 0,0002$
	$3,55 \pm 0,01$	$1,94 \pm 0,01$	$0,0391 \pm 0,0002$
Curva 2	$3,72 \pm 0,01$	$2,06 \pm 0,01$	$0,0410 \pm 0,0003$
	$3,74 \pm 0,03$	$2,00 \pm 0,01$	$0,0411 \pm 0,0003$
Curva 3	$4,21 \pm 0,03$	$1,86 \pm 0,01$	$0,0430 \pm 0,0007$
	$3,11 \pm 0,03$	$1,74 \pm 0,01$	$0,0395 \pm 0,0003$
	$5,31 \pm 0,02$	$2,11 \pm 0,01$	$0,0484 \pm 0,0006$

^aCurvas preparadas e analisadas em dias diferentes. Os dois primeiros resultados para a Curva 1 foram coletados no mesmo dia e os dois últimos em outro dia. Os resultados para a Curva 2 foram coletados no mesmo dia. E os dois primeiros resultados para a Curva 3 foram coletados no mesmo dia e o terceiro em um dia diferente.

Na Tabela 4.5 tem-se os resultados para as três curvas em termos das intensidades de emissão do analitos.

Tabela 4.5. Inclinação obtida para diferentes curvas intensidade analito/Li.

Curva ^a	Na	K	Ca
	$b \pm s_b$	$b \pm s_b$	$b \pm s_b$
Curva 1	868,1 ± 1,3	426,3 ± 0,6	9,11 ± 0,08
	721,5 ± 1,2	404,3 ± 1,3	8,56 ± 0,07
	853,7 ± 1,4	466,6 ± 0,9	10,04 ± 0,03
	889,4 ± 0,8	459,4 ± 1,1	5,72 ± 0,05
Curva 2	892,4 ± 1,3	498,2 ± 0,5	9,72 ± 0,06
	879,7 ± 1,4	480,5 ± 1,1	9,30 ± 0,04
Curva 3	865,3 ± 2,8	503,4 ± 1,9	10,55 ± 0,04
	924,0 ± 1,0	435,1 ± 1,2	9,42 ± 0,05
	813,9 ± 3,4	340,2 ± 2,5	7,5 ± 0,1

^aCurvas preparadas e analisadas em dias diferentes. Os dois primeiros resultados para a Curva 1 foram coletados no mesmo dia e os dois últimos em outro dia. Os resultados para a Curva 2 foram coletados no mesmo dia. Para a Curva 3 os dois primeiros resultados foram coletados no mesmo dia e o terceiro em um dia diferente.

De acordo com as Tabelas 4.4 e 4.5 observam-se variações consideráveis entre os resultados mesmo entre os resultados de um mesmo dia. Os desvios padrão da inclinação são pequenos uma vez que as curvas de calibração para Na e K contém onze níveis e a curva para o Ca contém nove níveis, todos preparados em triplicatas independentes. Esse conjunto de dados atende às recomendações do Manual de Validação, mas por ser um conjunto grande, o desvio padrão da inclinação é pequeno.

4.3.2 Seletividade e Efeito de Matriz

A seletividade é a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analito(s) particular(es) em mistura(s) ou matriz(es) sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante. O Efeito de Matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando fenômenos de diminuição ou ampliação da resposta instrumental.⁸⁷

O Efeito de Matriz foi avaliado construindo-se curvas de adição de analito com todas as amostras que compõem grupo amostral e comparando-se as inclinações dessas curvas com a inclinação (b) da curva de calibração através de testes de hipótese (Teste-F e Teste-T) a 95% de confiança. Devido a instabilidade do equipamento

procedeu-se a leitura da curva de calibração seguida da leitura de seis curvas de adição, então o equipamento foi desligado por um período de uma hora, e as cinco curvas que restaram foram analisadas. Os resultados obtidos para curvas considerando a razão para adições de padrão de sódio são apresentados na Tabela 4.6, as amostras A05, A31 e A32 não foram consideradas pois as mesmas apresentam quantidades de sódio muito elevadas que com as adições não foi possível quantificar devido à limitação da escala do equipamento.

Tabela 4.6. Comparação da inclinação das curvas de adição do Na, obtidas para diferentes matrizes, com a inclinação da curva de calibração. Curvas da razão Na/Li. ($y=a+bx$)

Amostra	Oleaginosa	Curva de Adição	Curva de Calibração	Efeito de Matriz?
		$b \pm s_b$	$b \pm s_b$	
A18	Desconhecida	$4,82 \pm 0,05$	$5,31 \pm 0,02$	Sim
A19	Desconhecida	$5,2 \pm 0,1$		Não
A23	Sebo	$4,12 \pm 0,05$		Sim
A28	Soja	$3,0 \pm 0,3$		Sim
A29	Soja 60% + Sebo 40%	$4,6 \pm 0,2$		Sim
A34	Algodão	$5,35 \pm 0,03$		Não
A35	Algodão + Soja	$5,08 \pm 0,05$		Sim
A36	Óleo Residual	$5,07 \pm 0,05$		Sim

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.6 não há efeito de matriz para A19 e A34, e de acordo com os testes de hipótese há efeito de matriz para todas as demais, no entanto alguns pontos devem ser considerados: As amostras A28 e A23 foram analisadas após o desligamento do equipamento, por isso a inclinação é menor do que a da curva de calibração, conforme discutido no item anterior, há um problema de estabilidade do equipamento em que a reprodutibilidade fica bastante comprometida. Isso pode ser verificado pelos resultados obtidos para as curvas de adição construídas com as amostras A18, A19, A29, A34, A35 e A36 que foram analisadas no período da manhã junto com a curva de calibração, observa-se que os resultados são consideravelmente próximos, mas como os desvios são pequenos eles não foram considerados estatisticamente iguais pelos testes de hipótese.

O resultado obtido para as curvas de intensidade versus concentração tanto para as curvas de adição de Na quanto para a curva de calibração são apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Comparação da inclinação das curvas de adição do Na obtidas para diferentes matrizes com a inclinação da curva de calibração. Curvas de Intensidade de Emissão do Na. ($y=a+bx$)

Amostra	Oleaginosa	Curva de Adição	Curva de Calibração	Efeito de Matriz?
		$b \pm s_b$	$b \pm s_b$	
A18	Desconhecida	744,0 ± 8,4	813,9 ± 3,4	Sim
A19	Desconhecida	851,2 ± 4,3		Sim
A23	Sebo	911,6 ± 11,1		Sim
A28	Soja	1054,9 ± 14,2		Sim
A29	Soja+Sebo	913,6 ± 8,9		Sim
A34	Algodão	673,2 ± 6,9		Sim
A35	Algodão+Soja	746,0 ± 9,7		Sim
A36	Óleo Residual	861,1 ± 13,9		Sim

Os resultados apresentados na Tabela 4.7 são bastante discrepantes e mostram efeito de matriz para todas as amostras consideradas, esse fator pode ser atribuído à instabilidade do equipamento.

Os resultados obtidos para as curvas de adição de potássio das diferentes amostras em comparação com a curva de calibração em oleato de metila, levando-se em consideração a razão de sinais K/Li, são apresentados na Tabela 4.8. Foram realizados testes de hipótese a 95% de confiança para comparação dos valores.

Tabela 4.8. Comparação da inclinação das curvas de adição do K obtidas para diferentes matrizes com a inclinação da curva de calibração. Curvas da razão K/Li. ($y=a+bx$)

Amostra	Oleaginosa	Curva de Adição	Curva de Calibração	Efeito de Matriz?
		$b \pm s_b$	$b \pm s_b$	
A05	Girassol	1,74 ± 0,02	2,11 ± 0,01	Sim
A18	Desconhecida	1,87 ± 0,01		Sim
A19	Desconhecida	1,76 ± 0,01		Sim
A23	Sebo	1,76 ± 0,01		Sim
A28	Soja	1,76 ± 0,02		Sim
A29	Soja 60% + Sebo 40%	1,74 ± 0,01		Sim
A31	Soja 75% + Sebo 25%	2,04 ± 0,01		Sim
A32	Soja	1,89 ± 0,01		Sim
A34	Algodão	2,20 ± 0,03		Sim
A35	Algodão+Soja	2,31 ± 0,06		Sim
A36	Óleo Residual	2,32 ± 0,06		Sim

Em relação aos resultados obtidos para o K observa-se que os valores são relativamente próximos, mas devido à ordem dos desvios padrão (s_b) os valores da inclinação foram considerados estatisticamente diferentes a 95% de confiança. Na

Tabela 4.9 apresentam-se os resultados obtidos para as intensidades de emissão do potássio nas curvas de adição em comparação com a curva de calibração de intensidade. Da mesma forma que nos casos anteriores foram realizados testes de hipótese a 95% de confiança.

Tabela 4.9. Comparação da inclinação das curvas de adição do K obtidas para diferentes matrizes com a inclinação da curva de calibração. Curvas da Intensidade de Emissão do K. ($y=a+bx$)

Amostra	Oleaginosa	Curva de Adição	Curva de Calibração	Efeito de Matriz?
		$b \pm s_b$	$b \pm s_b$	
A05	Girassol	314,3 ± 5,3		Sim
A18	Desconhecida	268,8 ± 2,6		Sim
A19	Desconhecida	303,6 ± 2,6		Sim
A23	Sebo	388,7 ± 1,1		Sim
A28	Soja	370,1 ± 3,1		Sim
A29	Soja 60% + Sebo 40%	336,7 ± 3,1	340,2 ± 2,5	Não
A31	Soja 75% + Sebo 25%	332,8 ± 5,4		Não
A32	Soja	365,5 ± 1,8		Sim
A34	Algodão	272,7 ± 5,5		Sim
A35	Algodão+Soja	329,6 ± 11,0		Não
A36	Óleo Residual	274,9 ± 3,8		Sim

Como pode ser observado na Tabela 4.7 a maioria dos resultados são relativamente próximo ao valor da inclinação da curva de calibração, no entanto foi apresentado efeito de matriz para a algumas amostras.

A Tabela 4.10 contém os resultados obtidos para as inclinações das curvas de adição das diferentes oleaginosas em comparação com a inclinação da curva de calibração em oleato de metila para o cálcio. Foram que nos casos anteriores foram realizados testes de hipótese a 95% de confiança.

Tabela 4.10. Comparação da inclinação das curvas de adição do Ca obtidas para diferentes matrizes com a inclinação da curva de calibração. Curvas da razão Ca/Li. ($y=a+bx$)

Amostra	Oleaginosa	Curva de Adição	Curva de Calibração	Efeito de Matriz?
		$b \pm s_b$	$b \pm s_b$	
A05	Girassol	0,024 ± 0,001		Sim
A18	Desconhecida	0,061 ± 0,001		Sim
A19	Desconhecida	0,061 ± 0,001		Sim
A23	Sebo	0,057 ± 0,001		Sim
A28	Soja	0,062 ± 0,001		Sim
A29	Soja 60% + Sebo 40%	0,059 ± 0,001	0,048 ± 0,001	Sim
A31	Soja 75% + Sebo 25%	0,059 ± 0,002		Sim
A32	Soja	0,055 ± 0,001		Sim
A34	Algodão	0,059 ± 0,001		Sim
A35	Algodão+Soja	0,060 ± 0,001		Sim
A36	Óleo Residual	0,059 ± 0,001		Sim

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 4.10 observa-se que, exceto para amostra A05, todos os demais valores são bem próximos em termo numéricos, no entanto a inclinação obtida para a curva de calibração é menor do que para as inclinações das curvas de adição.

Conforme informado na parte experimental deste trabalho, as curvas de adição foram preparadas a partir de uma solução padrão obtida pela diluição de padrões organometálicos individuais de Na, K, Ca e Mg, já as curvas de calibração foram obtidas pela diluição de um padrão organometálico contendo 23 elementos. É possível que haja um efeito de interferentes presentes nas curva de calibração que não estão nas curvas de adição. De acordo com a literatura o Ca pode formar óxidos refratários em chamas frias como a de ar/GLP principalmente na presença de Al, P e Si.⁹¹ Esses elementos estão presentes no padrão multielementar utilizado nas curvas de calibração, com isso os resultados apresentados na Tabela 4.10 que parecem ser de um efeito de matriz, são na verdade consequência de uma interferência que poderia ter sido evitada se tivéssemos disponível no laboratório um padrão organometálico, em quantidade suficiente, sem esses elementos. Essa questão será verificada posteriormente através de ensaios complementares a este trabalho.

Por fim, na Tabela 4.11 serão apresentados os resultados das curvas de adição em comparação com a curva de calibração levando-se em consideração a

intensidade de emissão do Ca. Também foram realizados testes de hipótese a 95% de confiança na comparação dos resultados.

Tabela 4.11. Comparação da inclinação das curvas de adição do Ca obtidas para diferentes matrizes com a inclinação da curva de calibração. Curvas da Intensidade de Emissão do Ca. ($y=a+bx$)

Amostra	Oleaginosa	Curva de Adição	Curva de Calibração	Efeito de Matriz?
		$b \pm s_b$	$b \pm s_b$	
A05	Girassol	$5,4 \pm 0,2$		Sim
A18	Desconhecida	$9,4 \pm 0,1$		Sim
A19	Desconhecida	$9,9 \pm 0,2$		Sim
A23	Sebo	$12,4 \pm 0,2$		Sim
A28	Soja	$9,6 \pm 0,4$		Sim
A29	Soja 60% + Sebo 40%	$11,0 \pm 0,2$	$7,5 \pm 0,1$	Sim
A31	Soja 75% + Sebo 25%	$10,4 \pm 0,6$		Sim
A32	Soja	$10,4 \pm 0,2$		Sim
A34	Algodão	$7,2 \pm 0,2$		Não
A35	Algodão+Soja	$9,0 \pm 0,3$		Sim
A36	Óleo Residual	$8,4 \pm 0,2$		Sim

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 4.11 observa-se que as inclinações em termos da intensidade de emissão mostram-se diferentes para as diferentes oleaginosas.

A comparação das inclinações obtidas, para as curvas de adição utilizando diferentes biodieseis, com a inclinação da curva de calibração através de testes estatísticos (Teste-F e Teste T) a 95% de confiança, foi uma recomendação do Manual de Validação⁸⁷. Foi obtido como resultado que há efeito de matriz para os biodieseis analisados, no entanto, esse efeito de matriz é questionável pois, pode ser uma reflexo da baixa reprodutibilidade do equipamento. Outro fator que deve ser considerado é que as matrizes utilizadas apresentam quantidades dos analitos estudados. Conforme foi descrito, foram feitas adições de analito de até 1,5 mg/kg em todas elas, mas é importante ressaltar que, esse nível de concentração foi escolhido como nível máximo para que a faixa de trabalho das adições, independente da quantidade de analito presente na amostra, contemplasse a faixa de trabalho estipulada no procedimento (até 4,0 mg/kg), para as amostras cujas adições ultrapassaram 4,0 mg/kg, não foi considerada a curva de adição de analito. Assim, será concluído se há ou não efeito de

matriz, no ensaio de veracidade, ou seja, na comparação dos resultados obtidos pelo procedimento proposto, com os resultados obtidos pelo procedimento normalizado.

4.3.3 Precisão

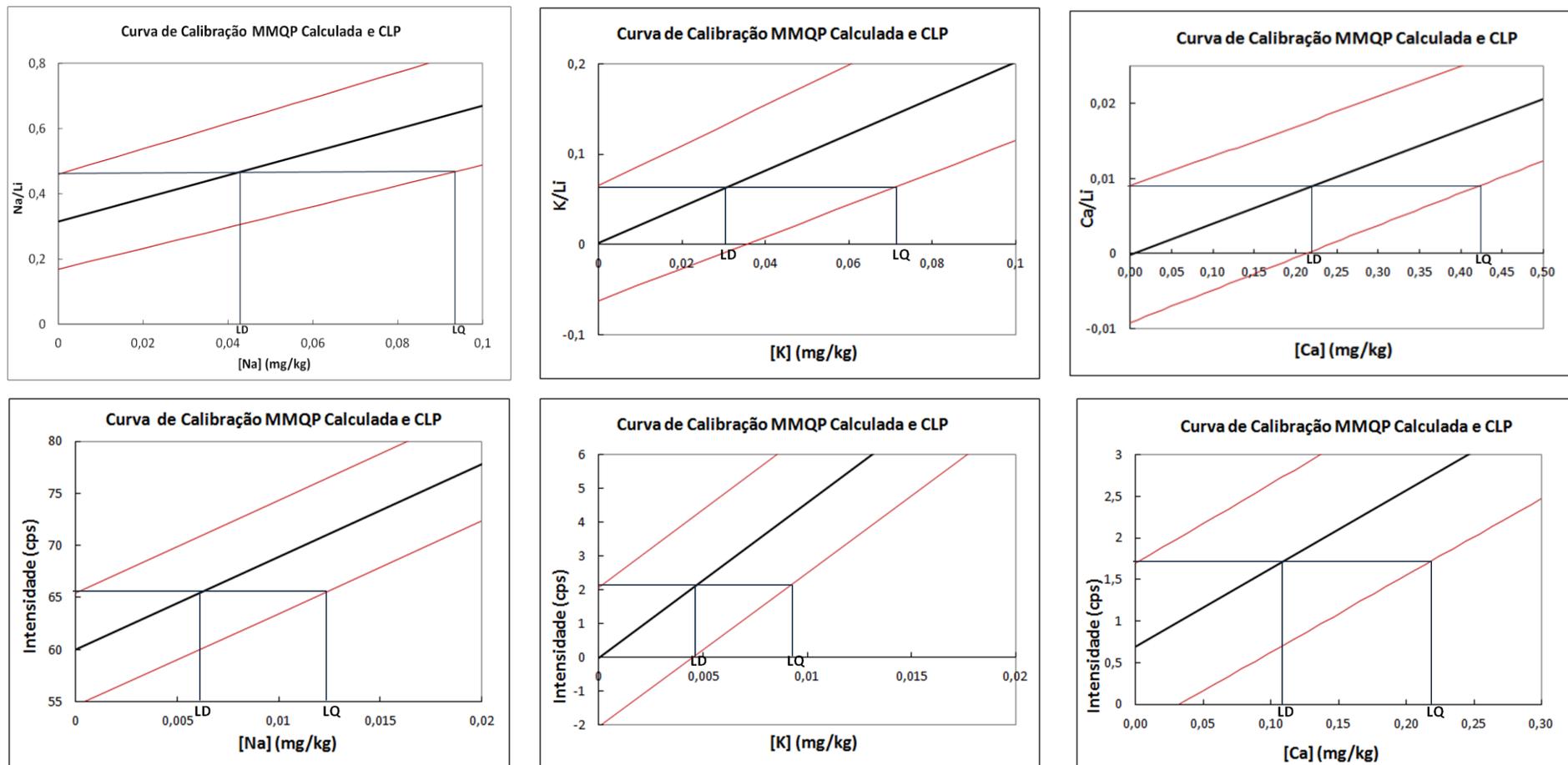
A precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre os ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas. A Repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição. A Precisão inetermediária (ou reprodutibilidade intralaboratorial) refere-se à precisão intermediária avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alternando algumas condições, tais como: dias de análise, analistas, equipamentos e condições ambientais, entre outras, se necessário.⁸⁷ A repetitividade da estimativa das concentrações dos analitos na amostra são cerca de 4% para concentrações abaixo de 0,5 mg/kg, e de 2% para concentrações acima de 0,5 mg/kg. Os valores são considerados satisfatórios pois admite-se que dispersões inferiores a 5% são adequadas.

4.3.4 Limite de detecção e Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração ou teor que pode ser quantificada.⁸⁶ Neste trabalho os limite de detecção e de quantificação foram estimados a partir das Curvas de Limite de Previsão para da curva analítica, os detalhes e equações utilizadas nessa estimativa constam no Anexo I. Foram plotados em conjunto os dados das curvas de calibração elaboradas e analisadas em três dias diferentes. A curva de calibração calculada e as Curvas de Limite de Previsão (CLP) são apresentadas nos Gráficos 4.7, tendo-se ampliada a região de interesse que foi utilizada para estimar o LD e o LQ para cada um dos analitos no método de calibração externa e no método de calibração externa com o uso de padrão interno.

Para encontrar os valores de LD e LQ a partir das curvas de limite de previsão, é necessário traçar uma reta a partir da origem da curva de limite de previsão superior até a curva de limite de previsão inferior. Essa reta é paralela ao eixo das concentrações (eixo x). O LD é encontrado após traçar uma reta paralela ao eixo y a partir do intercepto da reta traçada paralela ao eixo x até o próprio eixo x. O LQ é encontrado traçando-se uma reta paralela ao eixo y, com sua origem no intercepto da reta paralela ao eixo x e seu final no próprio eixo x. Conforme ilustram as Figuras 4.13.

Observa-se nas Figuras 4.13 que os resultados obtidos de LD e LQ para os Na, K e Ca são consideravelmente menores quando se considera a curva em termos das intensidades de emissão em comparação com a curva da razão entre a emissão do analito e a emissão do padrão interno. Isso indica que o método de calibração externa sem o uso de padrão interno é mais sensível que o método de calibração externa com padrão interno.



Figuras 4.13. Curvas de Limite de Previsão ampliadas na região de interesse e utilizadas para estimar o Limite de Detecção (LD) e no Limite de Quantificação (LQ) no método de calibração externa com o uso de padrão interno e no método de calibração externa. a) Na/Li, b) K/Li, c) Ca/Li, d)Na, e) K e f)Ca.

4.3.5 Veracidade

A veracidade é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro.⁸⁷ A recomendação do Manual de Validação é de que a veracidade seja avaliada com o uso de Material de Referência Certificado (MRC) ou que seja feito ensaio de adição/recuperação em matriz branca fortificada. Como não há MRC para biodiesel e não dispúnhamos de matriz branca para fazer os ensaios de adição e recuperação, neste trabalho fez-se a quantificação das amostras pelo procedimento proposto e pelo procedimento normalizado ABNT NBR 15556, considerando-se como valor verdadeiro o resultado obtido para o procedimento normalizado, Tabela 4.12. Foram realizados testes de hipótese a 95% de confiança para comparar os resultados. Os dados completos dos testes de hipótese (Teste-F e Teste-T), utilizados para comparar os resultados obtidos pelos procedimentos desenvolvidos no FAES e pelo procedimento normalizado, encontram-se no Anexo III.

Na quantificação pela análise direta em FAES, para as amostras que contém sódio acima de 5,00 mg/kg (A05, A31 e A32) foi feita diluição de duas vezes utilizando como solvente o oleato de metila para quantificar o sódio e o cálcio. Foi necessário quantificar o Ca através das amostras diluídas porque nas amostras concentradas devido à grande quantidade do Na, foi observado que o fenômeno da interferência que o sinal do sódio provoca no sinal do cálcio estava prejudicando a quantificação. Foi estabelecido então que amostras que contenham quantidades do analito acima do maior nível de concentração da curva devem ser diluídas no oleato de metila.

Segundo a norma ABNT NBR 15556 os limites de quantificação para Na, K e Ca são de 1,00 mg/kg, contudo, os LQ para esses analitos foram estimados para as condições de operação do Espectrômetro de Absorção Atômica do laboratório obtendo-se para o sódio 0,73 mg/kg, para o potássio 0,81 mg/kg e para o cálcio 1,78 mg/kg.

Tabela 4.12. Resultados das quantificações das amostras pelo procedimento proposto e pelo procedimento normalizado ABNT NBR 15556.

Amostra	Oleaginosa	[Na] ± s (mg/kg)			[K] ± s (mg/kg)			[Ca] ± s (mg/kg)		
		Análise direta-FAES		NBR 15556-AA	Análise direta-FAES		NBR 15556-AA	Análise direta-FAES		NBR 15556-AA
		Razão	Intensidade		Razão	Intensidade		Razão	Intensidade	
A05	Girassol	6,22±0,39 ^{ac}	5,69±0,11 ^{ac}	5,42±0,12	0,14±0,01 ^a	0,11±0,01 ^a	<0,81	1,74±0,14 ^{ac}	1,62±0,05 ^a	1,58±0,11
A18	Desconhecida	0,71±0,03 ^a	0,63±0,05 ^a	<0,73	<0,07	0,04±0,02	<0,81	<0,43	0,35±0,03	<1,78
A19	Desconhecida	0,62±0,04 ^a	0,58±0,05 ^a	<0,73	<0,07	0,05±0,03	<0,81	<0,43	0,31±0,01	<1,78
A23	Sebo	0,73±0,09 ^{ac}	0,61±0,06 ^{ac}	0,52±0,01	0,07±0,01 ^a	0,07±0,02 ^a	<0,81	0,40±0,06 ^a	0,34±0,06 ^a	<1,78
A28	Soja	1,83±0,04 ^{ac}	1,33±0,19 ^{ac}	1,07±0,10	0,07±0,00 ^a	0,06±0,02 ^a	<0,81	0,66±0,03 ^a	0,50±0,12 ^a	<1,78
A29	Soja 60% + Sebo 40%	0,61±0,08 ^{ac}	0,47±0,09 ^{ac}	0,56±0,03	<0,07	0,04±0,02 ^a	<0,81	0,40±0,04 ^a	0,31±0,07 ^a	<1,78
A31	Soja 75% + Sebo 25%	5,81±0,15 ^{ac}	5,78±0,10 ^{ac}	6,28±0,07	0,09±0,03 ^a	0,08±0,03 ^a	<0,81	1,87±0,04 ^{ac}	1,60±0,03 ^{ac}	1,69±0,10
A32	Soja	6,04±0,24 ^{ac}	5,55±0,11 ^{ac}	5,45±0,10	0,05±0,02 ^a	0,05±0,02 ^a	<0,81	1,54±0,10 ^{ac}	1,58±0,10 ^{ac}	1,52±0,10
A34	Algodão	0,25±0,01 ^a	0,19±0,01 ^a	<0,73	0,5561±0,0001 ^b	0,456±0,003 ^b	<0,81	0,370±0,001 ^b	0,283±0,004 ^b	<1,78
A35	Algodão+Soja	0,27±0,01 ^a	0,25±0,02 ^a	<0,73	1,36±0,02 ^{ac}	1,29±0,06 ^{ac}	1,31±0,13	0,44±0,02 ^a	0,424±0,001 ^a	<1,78
A36	Óleo Residual	1,70±0,05 ^{ac}	1,53±0,03 ^{ac}	1,61±0,05	0,06±0,02 ^a	0,07±0,02 ^a	<0,81	0,65±0,02 ^a	0,598±0,002 ^a	<1,78

^a Comparação dos resultados obtidos pelo procedimento de calibração externa sem o uso de padrão interno e com o uso de padrão interno, os resultados não diferem estatisticamente a 95% de confiança.

^b Comparação dos resultados obtidos pelo procedimento de calibração externa sem o uso de padrão interno e com o uso de padrão interno, os resultados são diferentes estatisticamente a 95% de confiança.

^c Comparação dos resultados obtidos pelo procedimento proposto e procedimento normalizado, os resultados não diferem estatisticamente a 95% de confiança.

^d Comparação dos resultados obtidos pelo procedimento proposto e procedimento normalizado, os resultados são diferentes estatisticamente a 95% de confiança.

Para resultados abaixo do Limite de Quantificação não foram consideradas as comparações.

4.3.6 Robustez

A robustez foi avaliada a partir de um planejamento fatorial completo com o ponto central apenas para se obter a melhor combinação entre os experimentos, esse ensaio é um ensaio semiquantitativo. Como foi feito um extenso trabalho para otimizar as condições de operação do equipamento e otimização do procedimento, a robustez foi avaliada considerando-se apenas as possíveis variações do fluxo dos gases combustível (GLP) e oxidante (ar). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.13. Antes de iniciar o experimento o fluxo dos gases foi regulado a partir do sinal do Na a 589,98 nm da solução de referência. Não foi possível mensurar a variação do fluxo de gases devido à escala do rotâmetro que compõe o equipamento, por isso, as variações são apresentadas de forma codificada, em que 1= variação positiva, -1= variação negativa, e 0 representa a ausência de variação.

Tabela 4.13. Resultados obtidos para o ensaio de robustez.

Experimento	Gases		Intensidade de Emissão (cps)				Razão		
	Ar	GLP	Na	Ca	K	Li	Na/Li	Ca/Li	K/Li
1	1	1	1190,0	11,2	520,8	316,2	3,87	0,036	1,65
2	1	0	1312,0	9,4	386,2	200,4	6,6	0,047	1,93
3	1	-1	829,0	4,9	211,0	77,3	10,7	0,064	2,73
4	0	1	1048,6	10,2	498,6	304,4	3,4	0,034	1,64
5	0	0	1192,4	9,4	391,4	206,2	5,8	0,045	1,90
6	0	-1	1128,9	8,3	379,4	204,1	5,5	0,041	1,86
7	-1	1	1048,0	10,2	495,5	309,8	3,4	0,033	1,60
8	-1	0	1090,1	8,3	382,0	202,9	5,4	0,041	1,88
9	-1	-1	1074,3	8,6	382,2	207,1	5,2	0,041	1,84

Com os resultados apresentados na Tabela 4.13 construíram-se superfícies de resposta da instensidades de emissão para cada analito e das razões das intensidades em função da variação dos fluxos dos gases com o programa Statistica®, Figura 4.14.

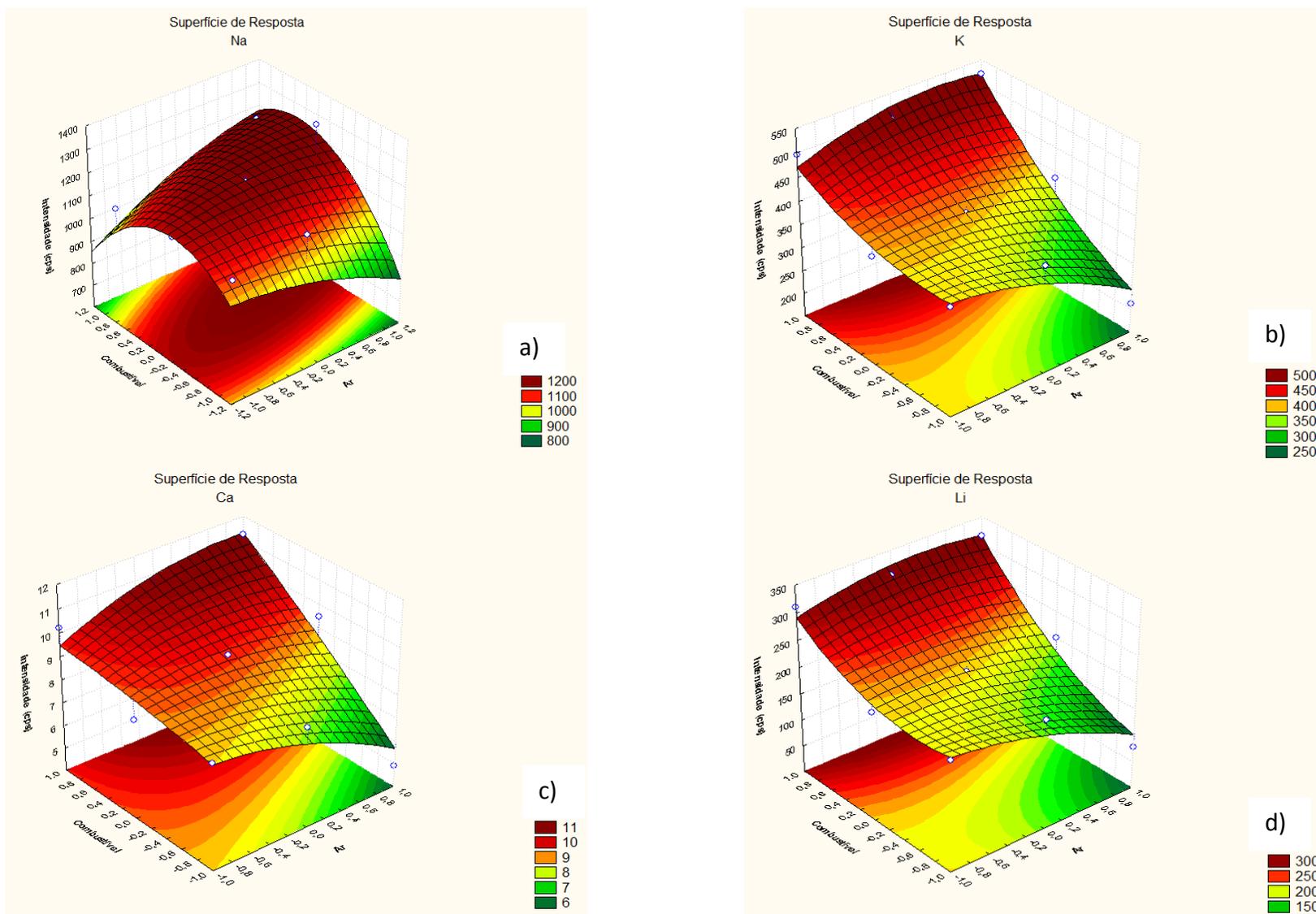


Figura 4.14. Superfícies de Resposta para as Intensidades de emissão dos analitos em função da variação do fluxo dos gases. a) Na, b) K, c) Ca e d) Li.

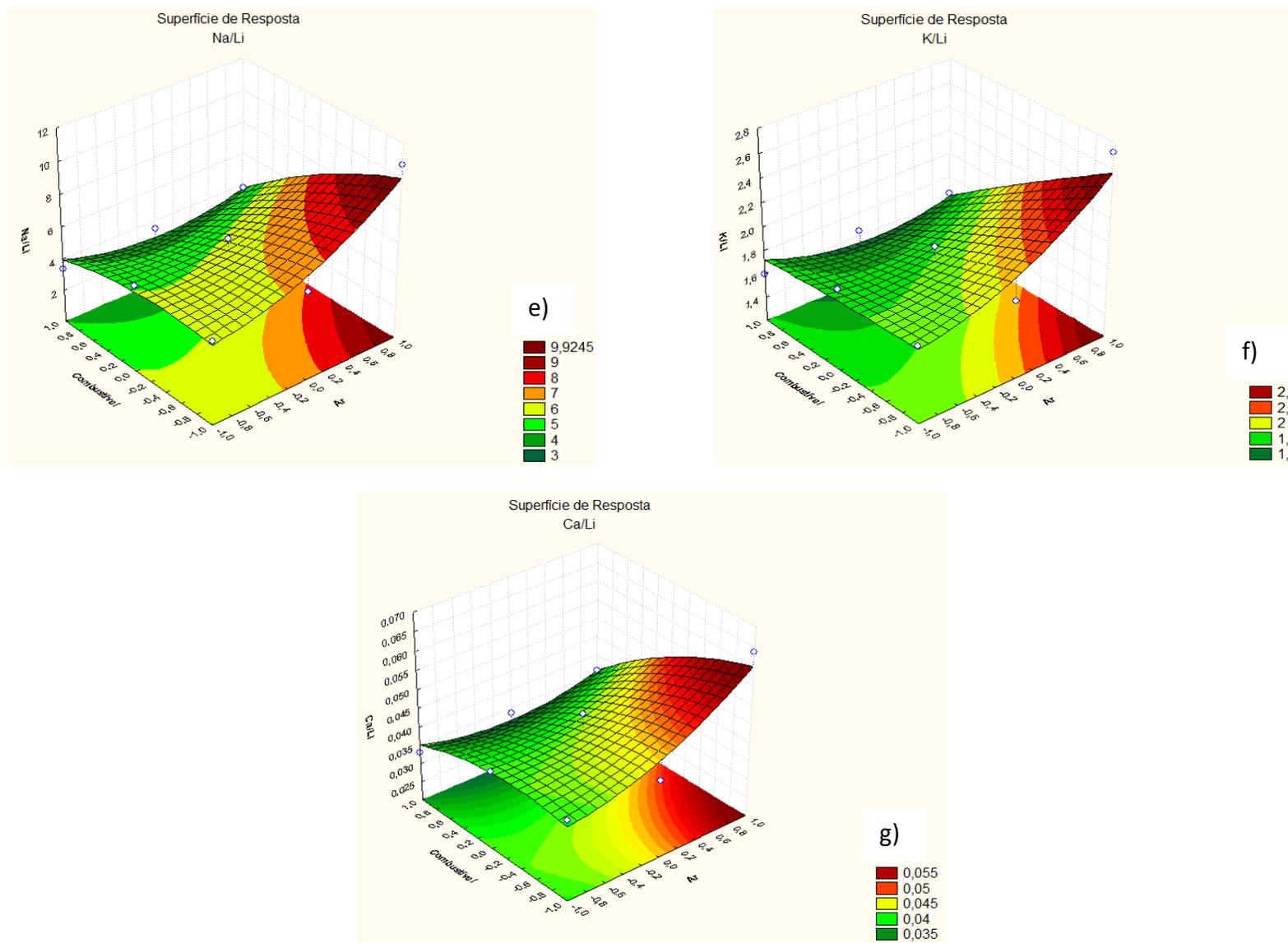


Figura 4.14. Superfícies de Resposta para as razões analito/padrão interno em função da variação do fluxo dos gases. e) Na/Li, f) K/Li e g) Ca/Li.

Analisando-se as Figuras 4.14 a)-d) observa-se que a maior intensidade de sinal para a combinação positiva das variações de fluxo dos gases. Isso pode ser devido ao fato de que com o maior fluxo, a quantidade de amostra é arrastada para o queimador é maior e conseqüentemente mais analitos tem acesso à chama provocando o aumento do sinal. No entanto, analisando-se as Figura 4.14 e)-f) observa-se que a maior razão analito/Li se dá para a condição de menor variação para o combustível e maior variação para o oxidante favorecendo, nesse caso, a obtenção de uma chama mais quente, conforme discutido anteriormente o comportamento desses analitos na chama depende sobretudo da temperatura da mesma. A presença do padrão interno influencia na interpretação do resultado não só pelas correções dos efeitos de nebulização, mas principalmente devido ao comportamento desse elemento na chama. Esse experimento ilustra ainda a dificuldade de se obter a reprodutibilidade das condições da chama e a dependência dos resultados com essas condições.

A robustez do procedimento, tanto quando são consideradas as curvas de intensidade quando são consideradas as curvas da razão dos sinais de emissão analito/Li, é dependente das condições de chama e dos fluxos de gases, caso seja possível minimizar essas variações é possível considerar o procedimento robusto.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi mencionado no decorrer do texto e ficou bastante claro durante a tentativa de validação do procedimento que há problemas de estabilidade e de reprodutibilidade do Espectrômetro de Emissão Atômica com detector de emissão contínua.

No decorrer do trabalho percebeu-se que era difícil controlar o fluxo dos gases de uma forma mais precisa, isso porque os rotâmetros utilizados na construção do equipamento apresentam uma escala inadequada para o controle da vazão, principalmente, do combustível. Uma melhoria que será feita posteriormente, é a instalação de rotâmetros com escala adequada para garantir que as variações de fluxo dos gases seja mínima e a estabilidade da composição da chama seja a maior possível.

As condições ambientais do laboratório também prejudicaram bastante o desenvolvimento do procedimento. Isso porque quando o laboratório atingia temperaturas superiores a 34 °C o sistema de detecção de emissão contínua começava a falhar e assim éramos impedidos de dar prosseguimento aos estudos. Além disso, condições de temperatura interfere no fluxo dos gases e conseqüentemente nas condições de operação da chama fazendo com que não fosse possível obter uma boa reprodutibilidade dos resultados. É necessário que haja um controle dessas condições para melhorar o desempenho do equipamento.

6 CONCLUSÃO

No desenvolvimento do procedimento observou-se que o uso do padrão interno é dispensável uma vez que os resultados obtidos por ambas metodologias não diferem estatisticamente a 95% de confiança e o comportamento do padrão interno influencia na interpretação das propriedades físicas que regem o sistema.

As condições instrumentais foram otimizadas e contribuíram para o entendimento das propriedades físicas apresentadas pelo sistema, como por exemplo, o efeito da temperatura da chama.

No processo de otimização das condições de aplicação do procedimento percebeu-se que as propriedades físico-químicas das soluções foram os principais fatores para garantir a maximização do sinal analítico. Foi possível, diminuir a viscosidade das soluções através do aumento da temperatura provocando aumento da taxa de aspiração das soluções e com isso aumento do sinal analítico.

O procedimento mostrou linearidade no intervalo de 0,05 a 10,0 mg/kg para o Na e o K e no intervalo de 0,25 a 50,0 mg/kg para o Ca, as faixas de trabalho foram limitadas até 4,0 mg/kg para todos os analitos. Os limites de quantificação foram estimados pelas curvas de limite de previsão e apresentaram valores na ordem de $\mu\text{g}/\text{kg}$ para Na e K devido a elevada sensibilidade que o procedimento apresentou para esses analitos e na ordem de mg/kg pois a sensibilidade para o Ca é consideravelmente menor.

Os resultados das quantificações dos analitos nas amostras foram comparados com as quantificações das amostras realizadas com o procedimento normalizado e os resultados não diferem estatisticamente a 95% de confiança. Esse fator demonstra que o efeito de matriz observado e os problemas com reprodutibilidade não afetam na quantificação dos analitos em amostras de diferentes matrizes. A análise direta e simultânea apresentou elevada sensibilidade para os analitos quando comparado com o procedimento normalizado ABNT NBR 15556.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LEI Nº 11.097, DE 13.1.2005 - DOU 14.1.2005, disponível em www.anp.gov.br acesso em 02 de janeiro de 2013.
2. LLAMAS, Alberto; GARCÍA-MARTÍNEZ, María-Jesús; AL-LAL, Ana-María, CANOIRA, Laurenano, LAPUERTA, Magín. Biokerosene from coconut and palm kernel oils: Production and properties of their blends with fossil kerosene. **Fuel**, 102, 483-490, 2012.
3. Organização Banco Nacional de Desenvolvimento Social (BNDES) e Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro, 2008.
4. HOEKMAN, S. Kent; BROCH, Amber; ROBBINS, Curtis; CENICEROS, Eric; NATARAJAN, Mani;.Review of biodiesel composition, properties, and specifications. **Renewable and Suitable Energy Reviews**, 16, 143-169, 2012.
5. AGARWAL, Avinash Kumar. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. **Progress in Energy Combustion Science**, 33, 3, 233-271, 2007.
6. DEMIRBAS, Ayhan. Progress and recent trends in biofuels. **Progress in Energy Combustion Science**, 33, 1-18, 2007.
7. LAPUERTA, Magín; ARMAS, Octavio, RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, José. Effect of biodiesel fuels on diesel engine emissions. **Progress in Energy Combustion Science**, 34, 198-223, 2008.
8. KNOTHE, Gerhard. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress in Energy Combustion Science**, 36, 364-373, 2010.
9. RESOLUÇÃO ANP Nº 7, DE 19.3.2008 - DOU 20.3.2008, disponível em www.anp.gov.br acesso em 02 de janeiro de 2013.

10. Standard specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels. Report no. D6751-08. ASTM; 2008.
11. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis- Superintendência de Refino e Processamento de Gás Natural– SRP. **Boletim Mensal de Biodiesel**, Dezembro de 2012. Disponível em www.anp.gov.br acesso em 06 de março de 2013.
12. Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB)- **Diretrizes**. Disponível em <http://www.mda.gov.br/portal/saf/programas/biodiesel/2286313> acesso em 27 de janeiro de 2013.
13. PINTO, Leandro Ferreira; DA SILVA, Diogo Italo Segalen; DA SILVA, Fabiano Rosa; et al.. Assessment of the feasibility of different oil sources to biodiesel production. **Acta Scientiarum Technology**, 34, 2, 227-231, 2012.
14. MOSER, Bryan R. Biodiesel production, properties, and feedstocks. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, 45, 229-266, 2009.
15. FUKUDA, Hideki; KONDO, Aakihiko; NODA, Hideo. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal Bioscience Bioenergy**, 92, 5, 405-416, 2001.
16. LOTERO, E; GOODWIN, JG; BRUCE DA; SUWANNAKARN, K; LIU Y; LOPEZ, DE. The catalysis of biodiesel synthesis. **Catalysis**, 19, 41-83, 2006.
17. PINTO, Angelo C.; GUARIEIRO, Lilian L.N.; REZENDE, Michelle J.C.; *et al.* Biodiesel: An overview. **Journal Brazilian Chemical Society**, 16, 6B, 1313-1330, 2005.
18. NARISIMHARAO, K; LEE, Adam; WILSON, Karen. Catalysts in production of biodiesel: A review. **Journal Biobased Materials and Bioenergy**, 1, 19-30, 2007.
19. BOER, Karne de; BAHRI, Parisa A. Supercritical methanol for fatty acid methyl ester production: A review. **Biomass and Bioenergy**, 35, 983-991, 2011.
20. GHADGE, Shashikant Vilas, RAHEMAN, Hifjur. Biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil having high free fatty acids. **Biomass and Bioenergy**, 28, 601-605, 2005.

21. RAMADHAS, A S; JAYARAJ, S; MURALEEDHARAN, C. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. **Fuel**, 84, 335-340, 2005.
22. XU, H; MIAO, Xialing; WU, Qingyu. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal de Biotechnology**. 126, 4, 499-507, 2006.
23. MIAO, Xiaoling; WU, Qingyu. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, 97, 841-846, 2006.
24. VELJKOVIC, V. B.; LAKICEVIC, S. H.; STAMENKOVIC, O. S., TODOROVIC, Z. B.; LAZIC, M. L. Biodiesel production from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil with a high content of free fatty acids. **Fuel**, 85, 2671-2675, 2006.
25. SAHOO, P. K.; DAS, L. M.; BABU, M. K. G.; NAIK, S. N. Biodiesel development from high acid value polanga seed oil and performance evaluation in a CI engine. **Fuel**, 86, 448-454, 2007.
26. TIWARI, Alok Kumar; KUMAR, Akhilesh; RAHEMAN, Hifjur. Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process. **Biomass and Bioenergy**, 31, 569-575, 2007.
27. SHARMA, Y. C.; SINGH, B. Development of biodiesel from karanja, a tree found in rural India. **Fuel**, 87, 1740-1742, 2008.
28. VARFOLOMEEV, S. D.; EFREMENKO, E. N.; KRYLOVA, L.P. Biofuels. **Russian Chemical Reviews**, 79, 6, 491-509, 2010.
29. SHIBASAKI-KITAKAWA, Naomi; HONDA, Hiroki; KURIBAYASHI, Homare; *et al.* Biodiesel production using anionic ion-exchange resins heterogeneous catalyst. **Bioresource Technology**. 98, 416-421, 2007.
30. LEUNG, D. Y. C.; GUO, Y. Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production. **Fuel Process Technology**, 87, 10, 883-890, 2006.

31. FREEDMAN B.; PRYDE E. H.; MOUNTS T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal American Oil Chemical Society**, 61, 1638-1643, 1984.
32. ENDALEW, Abebe K.; KIROS, Yohannes; ZANZI, Rolando. Inorganic heterogeneous catalysts for biodiesel production from vegetable oils. **Biomass and Bioenergy**, 35, 3787-3809, 2011.
33. BERNAL, Juana M.; LOZANO, Pedro; GARCIA-VERDUGO, Eduardo; *et al.* Supercritical synthesis of biodiesel. **Molecules**, 17, 8696-8719, 2012.
34. RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 66, 15–32, 2010.
35. GOG, Adriana; ROMAN, Marius; TOSA, Monica; PAIZS, Csaba; IRIMIÉ, Florin Dan. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. **Renewable Energy**, 39, 10–16, 2012.
36. WILSON, P. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, 29, 2, 82–93, 2009.
37. SAKA, S; KUSDIANA, D. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. **Fuel**, 80, 225-231, 2001.
38. KUSDIANA, D; SAKA, S. Methyl esterification of free fatty acids of rapeseed oil as treated in supercritical methanol. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, 34, 3, 383-387, 2001.
39. KUSDIANA, D; SAKA, S. Effects of water in biodiesel production by supercritical methanol treatment. **Bioresource Technology**, 91, 289-295, 2004.
40. Gunstone F. D.; Harwood J. L. The lipid handbook. 3rd ed. CRC, Boca Raton, pp 37–142; 2007.

41. KRALOVA, Iva; SJÖBLOM, Johan. Biofuels- Renewable Energy Sources: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31, 409-425, 2010.
42. ARICETTI, Juliana A.; TUBINO, Matthieu; MACIEL, Antonio J. S.; LOPES, Osvaldo. Método rápido e de baixo custo para determinação de índice de iodo de biodiesel. 32^a Reunião da Sociedade Anual Brasileira de Química, Fortaleza, 2009. Disponível em <http://www.s bq.org.br/32ra>. Acesso 27 de janeiro de 2013.
43. CAVALCANTE, Raquel Massad. **Predição da densidade de biodiesel proveniente de diferentes matérias-primas**. 2010. Dissertação- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
44. SAINT'PIERRE, T. D.; DIAS, L. F.; MAIA, S. M.; CURTIUS, A. J.; Determination of Cd, Cu, Fe, Pb and Tl in gasoline as emulsion by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry with analyte addition and isotope dilution calibration techniques. **Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy**, 59B, 4, 551-558, 2004.
45. EDLUND, M.; VISSER, H.; HEITLAND, P.; Analysis of biodiesel b argon-oxygen mixed-gas inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 232–235.
46. QUADROS, Daiane P. C.; RAU, Martinho; IDREES, Muhammad; *et al.*. A simple and fast procedure for the determination of Al, Cu, Fe and Mn in biodiesel using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy**, 66, 373-377, 2011.
47. SAINT'PIERRE, T. D.; DIAS, L. F., POZEBON D.; AUCELIO R. Q.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B. Determination of Cu, Mn, Ni and Sn in gasoline by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry and emulsion sample introduction. **Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy**, 57, 1991–2001, 2002.

48. CHAVES, Eduardo S.; LEPRI, Fábio G.; SILVA, Jesse S. A.; et al. Determination of Co, Cu, Fe, Mn, Ni e V em diesel and biodiesel samples by ETV-ICP-MS. **Journal of Environmental Monitoring**, 10, 1211-1216, 2008.
49. KORN, M. G. A.; SANTOS, D. S. S.; WELZ, B.; et al.. Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels: A review, **Talanta**, 73, 1-11, 2007.
50. DEMIRBAS, A. Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines, **Springer-Verlag**, London, 2008.
51. GRABOSKI, M. S.; MCCORMICK, R. L. Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines, **Progress in Energy Combustion Science**, 24, 125-164, 1998.
52. Norma Brasileira ABNT NBR 15553:2008. Produtos derivados de gorduras e óleos - Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos - Determinação dos teores de cálcio, magnésio, sódio, fósforo e potássio por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). **Associação Brasileira de Normas Técnicas-ABNT**, 2008.
53. 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**, 3, 5, 376-384, 2011.
54. Norma Brasileira ABNT NBR 15556:2008. Produtos derivados de óleos e gorduras- Ésteres metílicos/Étílicos de ácidos graxos- Determinação do teor de sódio, potássio, magnésio e cálcio por Espectrometria de Absorção Atômica. **Associação Brasileira de Normas Técnicas-ABNT**, 2008.
55. LEPRI, Fábio G.; CHAVES, Eduardo S.; Vieira, Mariana A.; et a.. Determination of trace elements in vegetable oils na biodiesel by atomic spectrometric techniques- A review. **Applied Spectroscopy Reviews**, 46, 3, 173-204, 2011.
56. SILVA, Jesse S. A.; CHAVES, Eduardo S.; DOS SANTOS, Éder J.; et al.. Calibration techniques and modifiers for the determination of Cd, Pb, and Tl in biodiesel as

micremulsion by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 21, 4, 620-626, 2010.

57. LOBO, Fabiana A.; GOVEIA, Danielle; Oliveira, Adriana P.; *et al.*. Comparison of the univariate and multivariate methods in the optimization of experimental conditions for determining Cu, Pb, Ni and Cd in biodiesel by GFAAS. **Fuel**, 88, 1907-1914, 2009.

58. LYRA, Fernanda H; CARNEIRO, M. T. W. D.; BRANDÃO, Geisamanda P.; *et al.*. Direct determination of phosphorus in biodiesel samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a solid sampling accessory. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 24, 1262-1266, 2009.

59. OLIVEIRA, Ligia C. C.; VIEIRA, Anderson; BAPTISTA, Paula M.; *et al.*. Determination of Na, K, Mg e Ca in biodiesel by LS F AAS and HR-CS F AAS: Studies that supported the proposal of the ABNT NBR 15556 norm. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 23, 7, 1400-1408, 2012.

60. LYRA, Fernanda H; CARNEIRO, M. T. W. D.; BRANDÃO, Geisamanda P.; *et al.*. Determination of Na, K, Ca and Mg, in biodiesel samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry using microemulsions as sample preparation. **Microchemical Journal**, 96, 180-185, 2010.

61. JESUS, Alexandre; SILVA, Márcia M.; VALE, Maria Goreti R.; The use of microemulsion for determination of sodium and potassium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 74, 1378-1384.

62. JESUS, Alexandre; SILVA, Márcia M.; VALE, Maria Goreti R.; *et al.*. Determination of Calcium na Magnesium um Biodiesel by Flame Atomic Absorption Spectrometry using microemulsions as sample preparation. **Energy and Fuels**, 24, 2109-2112, 2010.

63. YOUNG, Carl G.; AMAIS, Renata S.; SCHIAVO, Daniela; *et al.*. Determination of sulfur in biodiesel microemulsions using the summation of the intensities of multiple emission lines. **Talanta**, 84, 995-999, 2011.

64. FRYER, F. L.; WOODS, G. D.; Direct elemental analysis of biodiesel by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, 389, 753-761, 2007.
65. AMAIS, Renata S.; GARCIA, Edivaldo E.; MONTEIRO, Marcos R.; Direct analysis of biodiesel microemulsions using an inductively coupled plasma mass spectrometry. **Microchemical Journal**, 96, 146-150, 2010.
66. NOWKA, René. Determination of alkali elements in biodiesel by flame atomic emission spectrometry: A genuine alternative to ICP-OES. **GIT Labor-Fachzeitschrift**, 47, 518, 2003.
67. CHAVES, Eduardo S.; SAINT'PIERRE, Tatiana D.; TORMEN, Luciano, et al.. Determination of Na and K in biodiesel by flame atomic emission spectrometry and microemulsion sample preparation. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 19, 5, 856-861, 2008.
68. BARROS, Ariane Isis; Oliveira, Adriana P.; MAGALHÃES, Márcia R. L.; VILLA, Ricardo D.; Determination of sodium and potassium in biodiesel by flame atomic emission spectrometry, with dissolution in ethanol as a single sample preparation step. **Fuel**, 93, 381-384, 2012.
69. RAPOSO, Juliana Divina. **Determinação simultânea de sódio, potássio e cálcio em biodiesel por espectrometria de emissão atômica com chama utilizando emulsão como preparo das amostras**. 2010. Dissertação- Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.
70. PIOVEZAN, Marcel; COSTA, Ana Carolina O.; JAGER, Alessandra V.; DE OLIVEIRA, Marcione A. I.; MICKE, Gustavo A.. Development of a fast capillary electrophoresis method to determine inorganic cations in biodiesel samples. **Analytica Chimica Acta**, 673, 200-205, 2010.
71. NOGUEIRA, Thiago; DO LAGO, Claudimirm Lucio. Determination of Ca, K, Mg, Na, sulfato, phosphate, formate, acetate, propionate and glycerol in biodiesel by capillary

electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Microchemical Journal**, 99, 267-271, 2011.

72. MARTINIANO, Lorena C.; ABRANTES, Vivia R.; NETO, Sakae Y.; et al.. Direct simultaneous determination of Pb (II) and Cu (II) in biodiesel by anodic stripping voltammetry at a Mercury-film electrode using microemulsions. **Fuel**, 103, 1164-1167, 2013.

73. DONATI, George L.; AMAIS, Renata S.; NÓBREGA, Joaquim A.. Tungsten coil electrothermal matrix decomposition and sample vaporization to determine P and Si in biodiesel by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 28, 2, 280-287, 2013.

74. KRUG, Francisco José. **Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Piracicaba. 2010.

75. SNEDDON, J.; HARDAWAY, C.; BOBBADI, K. K.; REDDY, A. K. Sample Preparation of solid samples for metal determination by atomic spectroscopy—An overview and selected recent applications. **Applied Spectroscopy Reviews**, 41, 1, 1-14, 2006.

76. KORN, M. G. A.; MORT, E. S. B.; DOS SANTOS, D.C.M.B.; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; DOS SANTOS, W.P.C.; DOS SANTOS, E.B.G.N.; KORN, M. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods -A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, 43, 2, 67-92, 2008.

77. DE OLIVEIRA, Adriana Paiva; VILLA, Ricardo D.; ANTUNES, Keila C.P.; DE MAGALHÃES, Aparecida; E SILVA, Edinaldo Castro. Determination of sodium in biodiesel by flame atomic emission spectrometry using dry decomposition for the sample preparation. **Fuel**, 88, 764-766, 2009.

78. MENDIL, D.; OLUOZLU, O. D.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry. **Journal Hazardous Materials**. 165, 724-728, 2009.

79. BAKKALI, K.; BALLESTEROS, E.; SOUHAIL, B.; MARTOS, N. R. Determination of metal traces in vegetable oils from Spain and Morocco by graphite chamber atomic absorption spectroscopy following microwave digestion. **Grasas Aceites**. 60, 490-497, 2009.
80. ANSARI, R.; KAZI, T. G.; JAMALI, M. K.; ARAIN, M. B.; WAGAN, M. D.; JALBANI, N.; AFRIDI, H. I.; SHAH, A. Q. Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique. **Food Chemistry**. 115, 318-323, 2009.
81. ZEINER, M.; STEFFAN, I.; CINDRIC, I. J. Determination of trace elements in olive oil by ICP-AES and ETA-AAS: A pilot study on the geographical characterization. **Microchemical Journal**, 81, 171-176, 2005.
82. SANTOS, E. J.; HERRMANN, A. B.; CHAVES, E. S.; VECHIATTO, W. W. D.; SCHOEMBERGER, A. C.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Simultaneous determination of Ca, P, Mg, K and Na in biodiesel by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry with internal standardization after multivariate optimization. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, 22, 1300-1303, 2007.
83. BURGUERA, José Luis; BURGUERA, Marcela. Analytical applications of emulsions and microemulsions. **Talanta**, 96, 11-20, 2012.
84. VIEIRA, Mariana A.; DE OLIVEIRA, Lígia C. C.; GONÇALVES, Rodrigo A.; DE SOUZA, Vanderléa; DE CAMPOS, Reinaldo C.. Determination of As in vegetable oils and biodiesel by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Energy and Fuels**, 23, 5942-5946, 2009.
85. AMAIS, Renata S.; GARCIA, Edivaldo E.; MONTEIRO, Marcos R.; NÓBREGA, Joaquim A.. Determination of Ca, Mg e Zn in biodiesel microemulsions by FAAS using discrete nebulization. **Fuel**, 93, 167-171, 2012.
86. GHISI, Mirela; CHAVES, Eduardo S.; QUADROS, Daiane P. C.; MARQUES, Edmar P.; CURTIUS, Adilson J.; MARQUES, Aldaléa L. B.. Simple method for the determination of

Cu e Fe by electrothermal atomic absorption spectrometry in biodiesel treated with tetramethylammonium hydroxide. **Microchemical Journal**, 98, 62-65, 2011.

87. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) . **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília, 2011.

88. MEIER, Peter C.; ZÜND, Richard E.. **Statistical Methods in Analytical Chemistry**. New York, 1993.

89. Ficha de Segurança de Produtos Químicos- FISPQ. **Oleato de Metila**. Disponível em www.merckmillipore.com. Acesso em 29 de janeiro de 2013.

90. KNOTHE, Gerhard. “Designer” Biodiesel: Optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. **Energy and Fuels**, 22, 1358-1364, 2008.

91. WELZ, Bernard; SPERLING, Michael. **Atomic Absorption Spectrometry**. New Yoirk, 1999.

92. METCALFE, Ed; PRICHARD, F. Elizabeth. **Atomic Absorption and Emission Espectrocospy**. Chichester, 1987.

93. SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald M.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. **Fundamentos de Química analítica**. São Paulo, 2006.

94. VERDUZCO, Luis Felipe Ramírez. Density and viscosity of biodiesel as a function of temperature: Empirical models. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 19, 652-665, 2013.

ANEXO I

Equações utilizadas na Regressão Linear pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados Relativo (MMQPR) de acordo com instruções do MAPA.⁸⁷

Cálculo da estimativa dos parâmetros da regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP)

O modelo linear é dado pela equação A.I.1.

$$\hat{y}_i = a_w + b_w x_i \quad \text{A.I.1}$$

Onde:

- \hat{y}_i = variável dependente: é a resposta instrumental estimada pela equação de regressão do MMQP no i -ésimo nível de concentração.
- a_w = estimativa de MMQP da interseção de a .
- b_w = estimativa da inclinação b .
- x_i = variável independente: são as concentrações conhecidas do analito nas soluções padrão de calibração em cada nível de concentração.

Procede-se a estimação da inclinação (b_w) ou coeficiente angular, da interseção (a_w) ou intercepto ou coeficiente linear e das somas quadráticas (S_w) para o caso do MMQP.

$$b_w = \frac{S_{xyw}}{S_{xxw}} =$$

$$= \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \right)^2}$$

A.I.2

$$a_w = \bar{y}_w - b_w \bar{x}_w =$$

$$= \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \right)^2}$$

A.I.3

Onde:

$$w_i = \frac{k_{norm}}{s_{yi}^2} \quad \text{A.I.4}$$

Todas as respostas instrumentais médias (\bar{y}_{ij}) de um dado nível de concentração tem o mesmo peso w_y que é usado para as J respostas instrumentais médias de cada nível.

O valor de k_{norm} é a média das variâncias das respostas instrumentais dos I níveis de concentração da curva de calibração, conoforme definido na equação A.I.5.

$$k_{norm} = \overline{s_{yi}^2} = \frac{\sum_{i=1}^I s_{yi}^2}{I} \quad \text{A.I.5}$$

$$s_{yi}^2 = \frac{\sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_i)^2}{J - 1} \quad \text{A.I.6}$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L y_{ijl}}{J \times L} \quad \text{A.I.7}$$

$$\bar{y}_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^L y_{ijl}}{L} \quad \text{A.I.8}$$

$$\begin{aligned} S_{xyw} &= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - \bar{x}_w) (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_w) = \\ &= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} \end{aligned} \quad \text{A.I.9}$$

$$\begin{aligned}
S_{xxw} &= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - \bar{x}_w)^2 = \\
&= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \right)^2
\end{aligned}
\tag{A.I.10}$$

O denominador na equação A.I.2 e na equação A.I.3 é o S_{xxw} definido na equação A.I.10.

$$\bar{y}_w = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L w_i y_{ijl}}{Lx \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i}
\tag{A.I.11}$$

$$\bar{x}_w = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L x_i}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L w_i}
\tag{A.I.12}$$

As variâncias ou quadrados dos desvios padrão s^2 , do intercepto e da inclinação, assim como a covariância, $cov(a_w, b_w)$ entre eles são dadas por:

$$s^2(a_w) = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2}{S_{xxw}} \times k_{norm}
\tag{A.I.13}$$

$$s^2(b_w) = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i}{S_{xxw}} \times k_{norm}
\tag{A.I.14}$$

$$s_{a_w b_w}^2 = cov(a_w, b_w) = - \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i}{S_{xxw}} \times k_{norm}
\tag{A.I.15}$$

O resíduo da regressão (e_{vijl}) para cada uma das N_y respostas instrumentais é:

$$e_{yijl} = y_{ijl} - \hat{y}_i = y_{ijl} - (a_w + b_w x_i) \quad \text{A.I.16}$$

A variância residual do ajuste obtida dos resíduos dados pela equação A.I.16 não tem nenhum significado no MMQP. Define-se também o resíduo ponderado e_{yijlw} como:

$$e_{yijlw} = w_i(y_{ijl} - \hat{y}_i) = w_i[y_{ijl} - (a_w + b_w x_i)] \quad \text{A.I.17}$$

A variância residual do ajuste obtida dos resíduos dados pela equação A.I.17 representa a variância do ponto de peso unitário, que raramente faz parte dos valores experimentais.

Qualidade do ajuste e Verificação da heterocedascidade da resposta instrumental na regressão pelo MMQP.

Calcular os N_y resíduos normalizados $e_{yijl,norm}$ a partir da regressão ponderada, usando a equação A.I.1. Esses resíduos normalizados são na verdade estatísticas t de Student.

$$e_{yijl,norm} = \frac{e_{yijl}}{S_{res,yi}} \quad \text{A.I.18}$$

Construir o Gráfico de dispersão dos resíduos normalizados da regressão em função da concentração para comprovar a não homogeneidade das variâncias (heterocedascidade).

Avaliação dos pontos duvidosos e critérios de aceitação para linearidade no MMQP.

Avaliar os pontos duvidosos da curva de calibração por meio da estatística:

$$t_{yijl,calc} = \frac{|e_{yijl}|}{S_{res,yi}} = |e_{yijl,norm}| \quad \text{A.I.19}$$

Onde:

- $e_{ijl} = y_{ijl} \text{ medido} - y_i \text{ calculado}$. Notar que não é o resíduo ponderado definido na eq. (A.I.17) e sim o da eq. (A.I.16).

- S_{res,y_i} = desvio padrão amostral das respostas instrumentais do i-ésimo nível de concentração calculado pela equação A.I.20

$$S_{res,y_i} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L (y_{ijl} - \hat{y}_i)^2}{JxL - 1}} \quad \text{A.I.20}$$

Se o valor de $t_{y_{ijl}, calc}$ para um ponto duvidoso de uma curva de calibração for menor ou igual ao valor de t crítico tabelado, bilateral, para o nível de confiança de 95% e $(JxL-1)$ graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear.

Calcular o coeficiente de correlação linear (r_w) pelo MMQP:

$$\begin{aligned} r_w &= \frac{S_{xyw}}{\sqrt{S_{xxw}S_{yyw}}} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - \bar{x})(\bar{y}_{ij} - \bar{y})}{\left[\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (\bar{y}_{ij} - \bar{y})^2 \right]^{\frac{1}{2}}} \\ &= \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} (x_i - \bar{x})}{\left[\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (\bar{y}_{ij} - \bar{y})^2 \right]^{\frac{1}{2}}} = \\ &= \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij} - \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}}{\left[\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \times \left[\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}} \end{aligned}$$

A.I.21

Onde:

$$\begin{aligned} S_{yyw} &= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_w)^2 = \\ &= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}^2 - \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} \right)^2 = \end{aligned}$$

$$= \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij}^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L w_i y_{ijl} \right)^2}{L^2} \quad \text{A.I.22}$$

Critério de aceitação para linearidade. Calcular a estatística t_{rw} :

$$t_{rw} = \frac{|r_w| \sqrt{N_x - 2}}{\sqrt{1 - r_w^2}} = |r_w| \sqrt{\frac{N_x - 2}{1 - r_w^2}} \quad \text{A.I.23}$$

Se o valor de t_{rw} para a regressão da curva de calibração for maior ou igual ao valor de t crítico (tabelado) bilateral, para nível de confiança igual a 95% e $(N_x - 2)$ graus de liberdade, considera-se que a faixa é linear.

$$\sum_{i=1}^I x_i = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L x_{ijl}}{JxL} \quad \text{onde } x_{ijl} = x_i \quad \forall j \text{ e } \forall l$$

ANEXO II

Equações para cálculo das Curvas de Limite de Previsão (CLP)

As curvas de Limite de Previsão no contexto do MMQP somente informam a região ao redor da reta onde deve-se encontrar uma dada porcentagem dos pontos usados para calibração e podem ser construídas da seguinte forma:

Considere um ponto x^* , do ajuste da curva pelo MMQP obtem-se os parâmetros a_w e b_w que serão usados para estimar y^* pois:

$$y^* = a_w + b_w x^* \quad (\text{A.I.1}).$$

A variância da nova respostas instrumentais (y^*) serão estimada pelo modelo aplicado no gráfico das variâncias das respostas instrumentais em função dos níveis de concentração na planilha de ajuste dos dados, ou pela equação.

$$s_{LC}^2(y^*) = s^2(a_w) + (x^*)^2 s^2(b_w) + 2x^* \text{cov}(a_w, b_w) \quad \text{A.II.1}$$

As variâncias das novas respostas instrumentais nas curvas de limite de previsão serão dadas por:

$$s_{LP}^2(y^*) = s^2(y^*) + s^2(a_w) + (x^*)^2 s^2(b_w) + 2x^* \text{cov}(a_w, b_w) \quad \text{A.II.2}$$

Assim, a CLP do MMQP, serão obtidas pelos Limites de Previsão- LP_y dados pela equação abaixo:

$$LP_y = y^* \pm t_{\alpha/2; N-2} \sqrt{(s_{LP}^2(y^*))} = y^* \pm \Delta LP_y \quad \text{A.II.3}$$

ANEXO III

Nas Tabelas apresentadas neste anexo tem-se os dados encontrados nas quantificações pelos procedimentos com padrão interno, sem padrão interno e pelo procedimento normalizado. Nessas Tabelas encontram-se os dados brutos, devendo ser ignorados os resultados inferiores aos limites de quantificação estimados para cada um dos procedimentos e que foram apresentados no decorrer do texto.

O objetivo da apresentação dessas Tabelas é esclarecer para o leitor a origem dos dados e os testes de hipótese que foram aplicados a um nível de confiança de 95%.

Tabela AIII. 1. Comparação dos resultados obtidos por FAES pelo método da calibração externa, considerando apenas a intensidade de sinal do Na, com os resultados obtidos pelo procedimento normalizado ABNT NBR 15556.

Analito- Na												
Amostra	FAES- Intensidade		ABNT NBR 15556		n	F _{calc}	F _{tab}	Variâncias	t _{calc}	GL	t _{tab}	Médias
	Média	Desv. Pad	Média	Desv. Pad								
A05	5,69	0,11	5,42	0,12	5	1,26	7,15	Iguais	1,37	8,00	2,75	Iguais
A18	0,63	0,05	0,26	0,01	5	23,92	7,15	Diferentes	17,97	4,50	3,50	Diferentes
A19	0,58	0,05	0,18	0,01	5	26,38	7,15	Diferentes	18,52	4,45	3,50	Diferentes
A23	0,61	0,06	0,52	0,01	5	58,14	7,15	Diferentes	3,30	4,21	3,50	Iguais
A28	1,33	0,19	1,07	0,10	5	3,47	7,15	Iguais	0,97	8,00	2,75	Iguais
A29	0,47	0,09	0,56	0,03	5	9,91	7,15	Diferentes	2,06	5,20	3,16	Iguais
A31	5,78	0,10	6,28	0,07	5	1,99	7,15	Iguais	3,29	8,00	2,75	Diferentes
A32	5,55	0,11	5,45	0,10	5	1,18	7,15	Iguais	0,53	8,00	2,75	Iguais
A34	0,19	0,01	0,27	0,01	5	2,66	7,15	Iguais	3,70	8,00	2,75	Diferentes
A35	0,25	0,02	0,34	0,02	5	1,70	7,15	Iguais	2,27	8,00	2,75	Iguais
A36	1,53	0,03	1,61	0,05	5	0,41	7,15	Iguais	1,11	8,00	2,75	Iguais

Tabela AIII. 2. Comparação dos resultados obtidos por FAES pelo método da calibração externa, considerando apenas a intensidade de sinal do K, com os resultados obtidos pelo procedimento normalizado ABNT NBR 15556.

Analito-K												
Amostra	FAES- Intensidade		ABNT NBR 15556		Testes de Hipótese							
	Média	Desv. Pad	Média	Desv. Pad	n	F _{calc}	F _{tab}	Variâncias	t _{calc}	GL	t _{tab}	Médias
A05	0,11	0,01	0,20	0,09	5	47,43	7,15	Diferentes	2,08	4,25	3,50	Iguais
A18	0,04	0,02	0,01	0,05	5	6,35	7,15	Iguais	0,46	8,00	2,75	Iguais
A19	0,05	0,03	0,18	0,19	5	53,99	7,15	Diferentes	1,48	4,22	3,50	Iguais
A23	0,07	0,02	0,10	0,09	5	22,27	7,15	Diferentes	0,81	4,54	3,50	Iguais
A28	0,06	0,02	0,23	0,06	5	11,18	7,15	Diferentes	5,71	5,07	3,16	Diferentes
A29	0,04	0,02	0,25	0,09	5	16,09	7,15	Diferentes	5,12	4,74	3,50	Diferentes
A31	0,08	0,03	0,35	0,14	5	17,17	7,15	Diferentes	4,32	4,70	3,50	Diferentes
A32	0,05	0,02	0,38	0,10	5	18,93	7,15	Diferentes	7,04	4,63	3,50	Diferentes
A34	0,46	0,00	0,92	0,08	5	1078,31	7,15	Diferentes	12,39	4,01	3,50	Diferentes
A35	1,29	0,06	1,31	0,13	5	4,82	7,15	Iguais	0,12	8,00	2,75	Iguais
A36	0,07	0,02	0,15	0,12	5	31,06	7,15	Diferentes	1,49	4,39	3,50	Iguais

Tabela AIII. 3. Comparação dos resultados obtidos por FAES pelo método da calibração externa, considerando apenas a intensidade de sinal do Ca, com os resultados obtidos pelo procedimento normalizado ABNT NBR 15556.

Analito- Ca												
Amostra	FAES- Intensidade		ABNT NBR 15556		n	F _{calc}	F _{tab}	Variâncias	t _{calc}	GL	t _{tab}	Médias
	Média	Desv. Pad	Média	Desv. Pad								
A05	1,62	0,05	1,58	0,11	5	4,15	7,15	Iguais	0,26	8,00	2,75	Iguais
A18	0,35	0,03	0,48	0,07	5	6,54	7,15	Iguais	1,49	8,00	2,75	Iguais
A19	0,31	0,01	0,67	0,10	5	65,88	7,15	Diferentes	8,18	4,18	3,50	Diferentes
A23	0,34	0,06	0,53	0,11	5	3,16	7,15	Iguais	1,25	8,00	2,75	Iguais
A28	0,50	0,12	0,50	0,12	5	1,00	7,15	Iguais	0,01	8,00	2,75	Iguais
A29	0,31	0,07	0,44	0,06	5	1,18	7,15	Iguais	1,18	8,00	2,75	Iguais
A31	1,60	0,03	1,69	0,10	5	13,50	7,15	Diferentes	1,91	4,88	3,50	Iguais
A32	1,58	0,10	1,58	0,10	5	1,00	7,15	Iguais	4,77	8,00	2,75	Diferentes
A34	0,28	0,00	0,14	0,06	5	204,55	7,15	Diferentes	5,64	4,06	3,50	Diferentes
A35	0,42	0,00	0,22	0,13	5	25459,12	7,15	Diferentes	3,63	4,00	3,50	Diferentes
A36	0,60	0,00	0,88	0,07	5	1112,63	7,15	Diferentes	8,91	4,01	3,50	Diferentes

Tabela AIII. 4. Comparação dos resultados obtidos por FAES pelo método da calibração externa com padrão interno, considerando apenas a razão de sinais Na/Li, com os resultados obtidos pelo procedimento normalizado ABNT NBR 15556.

Analito- Na												
Amostra	FAES- Razão		ABNT NBR 15556		Testes de Hipótese							
	Média	Desv. Pad	Média	Desv. Pad	n	F _{calc}	F _{tab}	Variâncias	t _{calc}	GL	t _{tab}	Médias
A05	6,22	0,39	5,42	0,12	5	10,50	7,15	Diferentes	4,42	5,13	3,16	Diferentes
A18	0,71	0,03	0,26	0,01	5	11,51	7,15	Diferentes	30,62	5,03	3,16	Diferentes
A19	0,62	0,04	0,18	0,01	5	23,25	7,15	Diferentes	21,91	4,52	3,50	Diferentes
A23	0,73	0,09	0,52	0,01	5	129,72	7,15	Diferentes	5,31	4,09	3,50	Diferentes
A28	1,83	0,04	1,07	0,10	5	5,52	7,15	Iguais	5,44	8,00	2,75	Diferentes
A29	0,61	0,08	0,56	0,03	5	7,18	7,15	Diferentes	1,25	5,64	3,16	Iguais
A31	5,81	0,15	6,28	0,07	5	4,37	7,15	Iguais	2,30	8,00	2,75	Iguais
A32	6,04	0,24	5,45	0,10	5	5,34	7,15	Iguais	1,79	8,00	2,75	Iguais
A34	0,25	0,01	0,27	0,01	5	1,12	7,15	Iguais	1,53	8,00	2,75	Iguais
A35	0,27	0,01	0,34	0,02	5	10,77	7,15	Diferentes	7,80	5,11	3,16	Diferentes
A36	1,70	0,05	1,61	0,05	5	1,05	7,15	Iguais	0,92	8,00	2,75	Iguais

Tabela AIII. 5. Comparação dos resultados obtidos por FAES pelo método da calibração externa com padrão interno, considerando apenas a razão de sinais K/Li, com os resultados obtidos pelo procedimento normalizado ABNT NBR 15556.

Analito- K												
Amostra	FAES- Razão		ABNT NBR 15556		Testes de Hipótese							
	Média	Desv. Pad	Média	Desv. Pad	n	F_{calc}	F_{tab}	Variâncias	t_{calc}	GL	t_{tab}	Médias
A05	0,14	0,01	0,20	0,09	5	54,47	7,15	Diferentes	1,38	4,22	3,50	Iguais
A18	0,04	0,01	0,01	0,05	5	14,32	7,15	Diferentes	1,19	4,83	3,50	Iguais
A19	0,04	0,02	0,18	0,19	5	101,45	7,15	Diferentes	1,55	4,12	3,50	Iguais
A23	0,07	0,01	0,10	0,09	5	52,89	7,15	Diferentes	0,78	4,23	3,50	Iguais
A28	0,07	0,00	0,23	0,06	5	160,38	7,15	Diferentes	5,70	4,07	3,50	Diferentes
A29	0,04	0,01	0,25	0,09	5	47,05	7,15	Diferentes	5,25	4,25	3,50	Diferentes
A31	0,09	0,03	0,35	0,14	5	26,54	7,15	Diferentes	4,25	4,45	3,50	Diferentes
A32	0,05	0,02	0,38	0,10	5	45,10	7,15	Diferentes	7,10	4,27	3,50	Diferentes
A34	0,5561	0,0001	0,92	0,08	5	447124,93	7,15	Diferentes	9,73	4,00	3,50	Diferentes
A35	1,36	0,02	1,31	0,13	5	75,09	7,15	Diferentes	0,72	4,16	3,50	Iguais
A36	0,06	0,02	0,15	0,12	5	62,73	7,15	Diferentes	1,52	4,19	3,50	Iguais

Tabela AIII. 6. Comparação dos resultados obtidos por FAES pelo método da calibração externa com padrão interno, considerando apenas a razão de sinais Ca/Li, com os resultados obtidos pelo procedimento normalizado ABNT NBR 15556.

Analito- Ca												
Amostra	FAES- Razão		ABNT NBR 15556		Testes de Hipótese							
	Média	Desv. Pad	Média	Desv. Pad	n	F _{calc}	F _{tab}	Variâncias	t _{calc}	GL	t _{tab}	Médias
A05	1,74	0,14	1,58	0,11	5	1,74	7,15	Iguais	0,72	8,00	2,75	Iguais
A18	0,38	0,02	0,48	0,07	5	7,32	7,15	Diferentes	3,17	5,61	3,16	Diferentes
A19	0,33	0,02	0,67	0,10	5	38,96	7,15	Diferentes	7,76	4,31	3,50	Diferentes
A23	0,40	0,06	0,53	0,11	5	2,79	7,15	Iguais	0,85	8,00	2,75	Iguais
A28	0,66	0,03	0,50	0,12	5	12,60	7,15	Diferentes	2,96	4,95	3,50	Iguais
A29	0,40	0,04	0,44	0,06	5	2,97	7,15	Iguais	0,46	8,00	2,75	Iguais
A31	1,87	0,04	1,69	0,10	5	5,79	7,15	Iguais	1,38	8,00	2,75	Iguais
A32	1,54	0,10	1,52	0,10	5	1,14	7,15	Iguais	0,14	8,00	2,75	Iguais
A34	0,370	0,001	0,14	0,06	5	11171,04	7,15	Diferentes	8,95	4,00	3,50	Diferentes
A35	0,44	0,02	0,22	0,13	5	41,99	7,15	Diferentes	3,89	4,29	3,50	Diferentes
A36	0,65	0,02	0,88	0,07	5	16,17	7,15	Diferentes	7,15	4,74	3,50	Diferentes

Tabela AIII. 7. Comparação dos resultados obtidos por FAES pelo método da calibração externa sem padrão interno em comparação com o procedimento com padrão interno, para o Na.

Analito- Na												
Amostra	Intensidade		Razão		Testes de Hipótese							
	Média	Desv. Pd	Média	Desv. Pd	n	F _{calc}	F _{tab}	Variâncias	t _{calc}	GL	t _{tab}	Médias
A05	5,16	0,67	7,36	0,40	3	2,80	15,44	Iguais	2,42	4,00	3,50	Iguais
A18	0,63	0,05	0,71	0,03	3	2,08	15,44	Iguais	1,21	4,00	3,50	Iguais
A19	0,58	0,05	0,62	0,04	3	1,13	15,44	Iguais	0,61	4,00	3,50	Iguais
A23	0,61	0,06	0,73	0,09	3	2,23	15,44	Iguais	1,00	4,00	3,50	Iguais
A28	1,33	0,19	1,83	0,04	3	19,16	15,44	Diferentes	4,43	2,42	6,21	Iguais
A29	0,47	0,09	0,61	0,08	3	1,38	15,44	Iguais	0,97	4,00	3,50	Iguais
A31	2,66	0,07	3,35	0,17	3	6,22	15,44	Iguais	3,19	4,00	3,50	Iguais
A32	4,73	0,07	5,74	0,51	3	57,36	15,44	Diferentes	3,39	2,14	6,21	Iguais
A34	0,19	0,01	0,25	0,01	3	2,37	15,44	Iguais	2,73	4,00	3,50	Iguais
A35	0,25	0,02	0,27	0,01	3	18,25	15,44	Diferentes	1,38	2,44	6,21	Iguais
A36	1,69	0,10	1,93	0,07	3	1,88	15,44	Iguais	1,62	4,00	3,50	Iguais

Tabela AIII. 8. Comparação dos resultados obtidos por FAES pelo método da calibração externa sem padrão interno em comparação com o procedimento com padrão interno, para o K.

Analito- K												
Amostra	Intensidade		Razão		Teste de Hipótese							
	Média	Desv. Pd	Média	Desv. Pd	n	F _{calc}	F _{tab}	Variâncias	t _{calc}	GL	t _{tab}	Médias
A05	0,11	0,01	0,14	0,01	3	0,87	15,44	Iguais	1,38	4,00	3,50	Iguais
A18	0,04	0,02	0,04	0,01	3	0,44	15,44	Iguais	0,14	4,00	3,50	Iguais
A19	0,05	0,03	0,04	0,02	3	0,53	15,44	Iguais	0,12	4,00	3,50	Iguais
A23	0,07	0,02	0,07	0,01	3	0,42	15,44	Iguais	0,07	4,00	3,50	Iguais
A28	0,06	0,02	0,07	0,00	3	0,07	15,44	Iguais	0,30	4,00	3,50	Iguais
A29	0,04	0,02	0,04	0,01	3	0,34	15,44	Iguais	0,03	4,00	3,50	Iguais
A31	0,08	0,03	0,09	0,03	3	1,55	15,44	Iguais	0,15	5,65	3,16	Iguais
A32	0,05	0,02	0,05	0,02	3	0,42	15,44	Iguais	0,07	4,86	3,50	Iguais
A34	0,46	0,00	0,56	0,00	3	414,65	15,44	Diferentes	67,79	2,02	6,21	Diferentes
A35	1,29	0,06	1,36	0,02	3	15,56	15,44	Diferentes	1,79	2,51	6,21	Iguais
A36	0,07	0,02	0,06	0,02	3	0,50	15,44	Iguais	0,05	4,00	3,50	Iguais

Tabela AIII. 9. Comparação dos resultados obtidos por FAES pelo método da calibração externa sem padrão interno em comparação com o procedimento com padrão interno, para o Ca.

Analito- Ca												
Amostra	Intensidade		Razão		Testes de Hipótese a 95% de confiança							
	Média	Desv. Pd	Média	Desv. Pd	n	F _{calc}	F _{tab}	Variâncias	t _{calc}	GL	t _{tab}	Médias
A05	1,99	0,17	2,64	0,24	3	2,07	15,44	Iguais	1,91	4,00	3,50	Iguais
A18	0,35	0,03	0,38	0,02	3	1,12	15,44	Iguais	0,83	4,00	3,50	Iguais
A19	0,31	0,01	0,33	0,02	3	1,69	15,44	Iguais	0,74	4,00	3,50	Iguais
A23	0,34	0,06	0,40	0,06	3	1,13	15,44	Iguais	0,60	4,00	3,50	Iguais
A28	0,50	0,12	0,66	0,03	3	12,60	15,44	Iguais	1,15	4,00	3,50	Iguais
A29	0,31	0,07	0,40	0,04	3	3,51	15,44	Iguais	1,07	4,00	3,50	Iguais
A31	0,90	0,03	1,07	0,06	3	4,15	15,44	Iguais	2,23	4,00	3,50	Iguais
A32	1,43	0,20	1,80	0,03	3	35,64	15,44	Diferentes	3,10	2,22	6,21	Iguais
A34	0,28	0,00	0,37	0,00	3	54,61	15,44	Diferentes	36,22	2,15	6,21	Diferentes
A35	0,42	0,00	0,44	0,02	3	606,27	15,44	Diferentes	1,55	2,01	6,21	Iguais
A36	0,60	0,00	0,65	0,02	3	68,81	15,44	Diferentes	4,79	2,12	6,21	Iguais