UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

LAURA ALVES DAS NEVES

AVALIAÇÃO DO PERFIL ISOTÓPICO DE $\delta^{13}C$ EM BIOCOMBUSTÍVEIS UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE RAZÃO ISOTÓPICA

RIO DE JANEIRO

2015

Laura Alves das Neves

AVALIAÇÃO DO PERFIL ISOTÓPICO DE $\delta^{13}C$ EM BIOCOMBUSTÍVEIS UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE RAZÃO ISOTÓPICA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em tecnologia de processos químicos e bioquímicos.

Orientador:

Donato Alexandre Gomes Aranda, D.Sc.

RIO DE JANEIRO

2015

N511a

Neves, Laura Alves das
Avaliação do Perfil Isotópico de ?13C em Biocombustíveis utilizando a Espectrometria de Massas de Razão Isotópica / Laura Alves das Neves. -- Rio de Janeiro, 2015.
129 f.

Orientador: Donato Alexandre Gomes Aranda.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2015.

1. Espectrometria de Massas de Razão Isotópica. 2. Etanol Combustível. 3. Pinhão manso. 4. Ésteres Metílicos. 5. Biodiesel. I. Aranda, Donato Alexandre Gomes , orient. II. Título.

Laura Alves das Neves

Avaliação do Perfil Isotópico de $\delta^{13}C$ em Biocombustíveis utilizando a Espectrometria de Massas de Razão Isotópica

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em tecnologia de processos químicos e bioquímicos.

Aprovada por:

(Donato Alexandre Gomes Aranda, D.Sc., EQ/UFRJ)

(Wilma de Araújo Gonzalez – IME)

(Aída Pereira Baêta – INMETRO)

(Annibal Duarte Pereira Netto – UFF)

(Luiz Antonio d'Avila - EQ/UFRJ)

(Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto - EQ/UFRJ)

À minha família, em especial aos meus pais,

Amaro Jorge *e* ***Maria do Carmo****.*

AGRADECIMENTOS

A execução e posterior redação de uma tese de doutorado é fruto de muita responsabilidade e “fadiga” individual. O apoio contínuo da família e o suporte dos amigos certamente foram muito importantes durante toda a trajetória...

E a todos aqueles que contribuíram de formas variadas, registro os meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente a Deus, por guiar e iluminar o meu caminho e pelas bênçãos a mim concedidas, sendo uma delas a execução deste doutorado.

Ao meu orientador e professor Dr. Donato Aranda pela confiança em mim depositada e por acreditar na minha capacidade profissional.

Ao Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), principalmente a Divisão de Metrologia Química e a Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (EQ/UFRJ) por possibilitarem a execução desta tese.

Em especial, minha gratidão a Vanderléa de Souza, por ter incentivado à minha qualificação profissional e que me permitiu conciliar a vida acadêmica com a jornada de trabalho no Inmetro.

Ao Valnei Smarçaro, chefe da Divisão de Metrologia Química pela coordenação da bolsa Faperj, ao Romeu Daroda, coordenador dos projetos de biocombustíveis do Inmetro, pela indicação do tema da tese e ao Paulo Silva, chefe do Laboratório de Motores e Combustíveis pela compreensão e apoio.

A Janaína Rodrigues Caixeiro, pelo apoio em todos os momentos, por estar sempre disposta a me ouvir e a me ajudar nas tomadas de decisões. Também sou grata a Eliane Pires Rego, chefe do laboratório de Análise Orgânica do Inmetro, pelo incentivo e apoio constantes, e pela amizade que surgiu ao longo dos anos.

Ao Gabriel Sarmanho, da Divisão de Metrologia Química do Inmetro, pela análise estatística dos dados.

Aos companheiros de trabalho, especialmente aos amigos Renato, Fernando, Tânia, e Maurício. A amizade, o carinho e a força de vocês foram cruciais em vários momentos.

As amigas Samantha e Thays, que choraram e vibraram comigo, agradeço por acompanharem a evolução deste trabalho desde o início.

As minhas queridas amigas Evelyn e Silvia, meu sincero agradecimento pela atenção nos momentos mais difíceis, a descontração nos momentos alegres e a torcida diária.

Ao meu grande amigo Osiris, pelo apoio, incentivo e paciência, mais ainda pela amizade que brinda desde muito antes...

A Maíra, embora seja impossível encontrar palavras para expressar toda a minha gratidão... Os meus sinceros agradecimentos a quem foi fundamental para a execução desse trabalho. Sou grata pelo suporte em todas as etapas e por acreditar que tudo daria certo! Obrigada pela colaboração, paciência e carinho.

Ao Gerente da Geoquímica do CENPES/Petrobras: Mário Duncan Rangel e em especial à equipe do Laboratório de Isótopos Estáveis: Alexandre Ferreira, Clarisse Lacerda Torres e Gabriel Moraes Silva pelo acolhimento e pelas contribuições fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa;

A Embrapa Solos pela doação das sementes de pinhão manso e ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), em especial ao Wokimar Teixeira Garcia, pelas amostras de etanol combustível de cana-de-açúcar de diferentes usinas.

Ao Professor Marcos Eberlin da Universidade Estadual de Campinas, pela colaboração científica e a gentileza na revisão dos artigos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) pelo apoio financeiro.

A minha família, em especial aos meus pais Amaro Jorge e Maria do Carmo, pelo amor e dedicação incondicionais, pelo encorajamento e conforto necessários nos meus momentos de fraqueza. A minha irmã Fabiana, sinônimo de força e coragem, por me ajudar a buscar o meu equilíbrio emocional. Obrigada por entenderem as minhas constantes ausências.

E a todos cujos nomes não foram citados, mas que contribuíram de forma direta ou indireta para que este trabalho fosse realizado,

A todos vocês, o meu muito obrigada!

''A persistência é o melhor caminho ao êxito.''

Charles Chaplin.

RESUMO

NEVES, Laura Alves. Avaliação do Perfil Isotópico de $\delta^{13}C$ em Biocombustíveis utilizando a Espectrometria de Massas de Razão Isotópica. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Neste trabalho foram avaliados os perfis isotópicos de $\delta^{13}C$ do etanol combustível e do biodiesel pela técnica de Espectrometria de Massas de Razão Isotópica (EMRI). Em um primeiro momento foi avaliada a influência de diferentes métodos de calibração e normalização na exatidão das medições do valor isotópico de $\delta^{13}C$, como os padrões usados na calibração do sistema e a coluna cromatográfica. Foram constatados que o padrão utilizado na calibração do sistema e a coluna cromatográfica têm um forte impacto nas medições dos valores isotópicos $\delta^{13}C$, destacando a importância do uso de materiais de referência certificados e adequados na calibração do sistema e na normalização dos resultados das medidas isotópicas. Os resultados de $\delta^{13}C$ obtidos pelos três métodos de normalização (curva de calibração, *single-point* e *bracketing)* foram comparados estatisticamente com os valores de $\delta^{13}C$ obtidos por AE-EMRI e foram equivalentes em desempenho. Em um segundo momento, com a análise estatística dos resultados, foi possível traçar o perfil isotópico do bioetanol de cana-de-açúcar no Brasil onde foi estabelecido o perfil probabilístico com 95 % dos valores na faixa entre -12,68 ‰ a -12,28 ‰. Em relação ao biodiesel, foi avaliada a assinatura isotópica de $\delta^{13}C$ do óleo de pinhão manso de diferentes origens geográficas e dos ésteres metílicos do biodiesel obtido a partir da transesterificação deste mesmo óleo. O uso de um padrão considerado *spiking* foi crucial na identificação de fracionamento isotópico no processo de transesterificação do biodiesel, que foi corrigido com a normalização dos resultados. O método proporcionou uma boa resolução para a separação de ésteres metílicos nas amostras de biodiesel de pinhão manso e seus valores de $\delta^{13}C$ foram determinados: C16:0 (-31,88 ‰), C18:0 (-32,12 ‰), C18:1 (-30,04 ‰) e C18:2 (34,28 ‰).

Palavras-Chave: Espectrometria de Massas de Razão Isotópica. Etanol Combustível. Pinhão manso. Ésteres Metílicos. Biodiesel.

ABSTRACT

NEVES, Laura Alves. Avaliação do Perfil Isotópico de $\delta^{13}C$ em Biocombustíveis utilizando a Espectrometria de Massas de Razão Isotópica. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

In this work, the isotopic profile $\delta^{13}C$ of bioethanol and biodiesel were evaluated by the technique of isotope ratio mass spectrometry (IRMS). At first, it was evaluated the influence of different methods of calibration and normalization on the accuracy of the isotopic value of $\delta^{13}C$ in bioethanol samples measurements. It was evaluated different calibration standards and chromatographic columns of different polarity, and it was observed that both the reference material used in isotopic calibration of the reference gas CO_2 and the chromatographic column, has a strong impact on the measurements of the $\delta^{13}C$ value. It was demonstrate the importance of suitable certified reference materials for system calibration and standardization of results. The $\delta^{13}C$ values obtained with the three methods of normalization (calibration curve, single-point and bracketing) were statistically compared with the $\delta^{13}C$ values obtained with elemental analysis/IRMS (EA-IRMS). A second time, with the statistical analysis it was possible to establish a probabilistic profile for the isotopic signature of sugarcane bioethanol in Brazil, where 95 % of the values were in the range between -12.68 ‰ to -12.28 ‰. In relation to biodiesel, the isotopic $\delta^{13}C$ of *jatropha curcas* oil of different regions was evaluated by AE-IRMS and fatty acid methyl esters obtained from transesterification of *jatropha curcas* oil by GC-C-IRMS. The use of a standard like *spiking* was fundamental in the identification of isotopic fractionation of biodiesel transesterification process, which was corrected with the normalization of the results. The mean isotope ratio values ($\delta^{13}C$) were determined for each methyl esther as follows: C16:0 (-31,88 ‰), C18:0 (-32,12 ‰), C18:1 (-30,04 ‰) and C18:2 (34,28 ‰).

Keywords: Isotope Ratio Mass Spectrometry. Ethanol Fuel. *Jatropha Curcas*. Methyl Esters. Biodiesel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Exemplos de variação isotópica natural de $\delta^{13}C$ agrupados de acordo com a origem ao longo da escala de abundância natural do $\delta^{13}C$ 34

Figura 2.2 Diagrama com a representação da separação isotópica do CO_2 36

Figura 2.3 Esquema do EMRI 36

Figura 2.4 Esquema do sistema CL-EMRI 37

Figura 2.5 Esquema do sistema AE-EMRI 38

Figura 2.6 Esquema do EMRI acoplado ao cromatógrafo à gás e interface com forno de combustão (CG-C-EMRI) 39

Figura 3.1 Esquema da avaliação da influência da coluna cromatográfica, do padrão de calibração e dos métodos de normalização das medidas isotópicas de $\delta^{13}C_{VPDB}$ para o etanol combustível 54

Figura 3.2 Cromatograma de amostra de etanol combustível obtido por CG-C-EMRI, utilizando a coluna capilar CP-WAX 58

Figura 3.3 Correlação dos resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) das amostras de etanol combustível por AE-EMRI versus os resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ das amostras de etanol combustível por CG-C-EMRI (método *bracketing* de normalização) 64

Figura 4.1 Distribuição dos dados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ do bioetanol de acordo com as variáveis: matéria-prima, metabolismo e origem geográfica 74

Figura 4.2 *Box plot* da distribuição dos dados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ de acordo com o metabolismo 75

Figura 4.3 Distribuição dos resultados de $\delta^{13}C$ das amostras analisadas de bioetanol de cana-de-açúcar produzidos no Brasil 76

Figura 4.4 Histograma dados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ do bioetanol de cana-de-açúcar 77

Figura 4.5 QQ-Plot da variável valor isotópico de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$) 78

Figura 4.6 (a) Estimativa da densidade de Kernel dos valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ do bioetanol de cana-de-açúcar e (b) Estimativa da densidade de kernel das 100 primeiras curvas das amostras bootstrap 79

Figura 4.7 Intervalo entre o limite inferior do quantil $Q_{0.025}$ e o limite superior do quantil $Q_{0.975}$ 81

Figura 5.1 Reação de transesterificação 91

Figura 5.2 Ésteres metílicos de ácidos graxos, com cadeias de 14 a 18 carbonos 92

Figura 5.3 Cromatograma de amostra de biodiesel obtido por CG-EM 104

Figura 5.4 Teor de cada éster (%) presente nas amostras de biodiesel de pinhão manso 105

Figura 5.5 Valores isotópicos das amostras do óleo de pinhão manso de diferentes regiões 108

Figura 5.6 Cromatogramas obtidos por CG-C-EMRI (a) mistura C18:0 Indiana + C22:0 *spiking*; (b) MRC de biodiesel de soja CRM 2772 NIST/INMETRO; (c) Biodiesel de pinhão manso + C19:0 + C22:0 110

Figura 5.7 Valores isotópicos $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos por CG-C-EMRI do padrão isotópico certificado C18:0 e do padrão C22:0 e seus respectivos valores certificados e de referência 112

Figura 5.8 Valores isotópicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ dos ésteres metílicos (C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2) de cada amostra de biodiesel de pinhão manso 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Abundâncias relativas de isótopos comumente analisados por EMRI 30

Tabela 2.2 Padrões internacionais para alguns elementos analisados por EMRI 32

Tabela 3.1 Amostras de etanol combustível de diferentes matérias-primas e diferentes regiões 47

Tabela 3.2 Resultados do teste de *Shapiro-Wilk* para o caso 1: coluna capilar DB-5 e a mistura de n-alcanos como o padrão de calibração 55

Tabela 3.3 Resultados do teste de *Shapiro-Wilk* para o caso 1: coluna capilar CP-WAX e a mistura de n-alcanos como o padrão de calibração 55

Tabela 3.4 Resultados do teste de *Shapiro-Wilk* para o caso 2: coluna capilar CP-WAX e a mistura de n-alcanos como o padrão de calibração 55

Tabela 3.5 Resultados do teste de *Shapiro-Wilk* para o caso 2: coluna capilar CP-WAX e padrão de etanol como o padrão de calibração 56

Tabela 3.6 Resultados do teste F para análise de variância para cada amostra, nos casos 1 e 2 56

Tabela 3.7 Resultados do teste t de Student para comparação das médias dos valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ para cada amostra, no caso 1 e no caso 2 56

Tabela 3.8 Resultados da pureza de cada amostra de etanol combustível analisadas por CG-DIC e suas respectivas incertezas 59

Tabela 3.9 Valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) para os materiais de referência por AE-EMRI

Tabela 3.10 Valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ das amostras de etanol combustível obtidos por AE-EMRI 60

Tabela 3.11 Resultados do teste F para análise de variância 60

Tabela 3.12 Resultados do teste t para comparação dos valores das médias dos $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos com AE-EMRI e CG-C-EMRI para as amostras de etanol combustível 61

Tabela 3.13 Resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) das amostras de etanol combustível obtidos por AE-EMRI (*bracketing*), CG-C-EMRI (curva de calibração), CG-C-EMRI (*single point*) e CG-C-EMRI (*bracketing*) 62

Tabela 3.14 ANOVA de um fator com blocos 62

Tabela 3.15 Resultados do Teste de Friedman 63

Tabela 4.1 Amostras de etanol combustível de cana-de-açúcar e suas respectivas origens e matérias-primas 70

Tabela 4.2 Distribuição de frequências das amostras de bioetanol de acordo com a matéria-prima e origem (diferentes regiões do Brasil e outros países) 73

Tabela 4.3 Medidas resumo do valor isotópico de carbono $\delta^{13}C_{VPDB}$ segundo o metabolismo e a matéria-prima 74

Tabela 5.1 Produtividade de oleaginosas no Brasil e indicadores de rendimento 87

Tabela 5.2 Composição méidia de ácidos graxos de diferentes óleos vegetais 89

Tabela 5.3 Propriedades do biodiesel de pinhão manso, canola e milho 89

Tabela 5.4 Razão isotópica de carbono ($\delta^{13}C$) de alguns óleos de diferentes origens 93

Tabela 5.5 Amostras de sementes e óleo de pinhão manso 95

Tabela 5.6 Rendimentos da extração do óleo (%) para cada amostra de sementes de pinhão manso 100

Tabela 5.7 Valores isotópicos do padrão C22:0 (*spiking*) 102

Tabela 5.8 Valores certificados e experimentais do MRC do biodiesel de soja do NIST 103

Tabela 5.9 Resultados dos parâmetros avaliados na validação 103

Tabela 5.10 Resultados do teor de ésteres metílicos totais (%) para cada biodiesel 104

Tabela 5.11 Teor dos ésteres metílicos (%) nas amostras de biodiesel de pinhão manso 105

Tabela 5.12 Verificação da calibração do sistema AE-EMRI 106

Tabela 5.13 Resultados dos valores isotópicos de $\delta^{13}C$ de óleos de pinhão manso provenientes de três diferentes extrações da mesma semente (amostra 813) 107

Tabela 5.14 Valores isotópicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ para amostras do óleo de pinhão manso de diferentes origens 107

Tabela 5.15 $\delta^{13}C_{VPDB}$ para os óleos de diferentes origens obtidos por AE-EMRI 108

Tabela 5.16 Valores isotópicos dos padrões C18:0 e C22:0 determinados por CG-C-EMRI 111

Tabela 5.17 Valores isotópicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ dos ésteres metílicos (C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2) de cada amostra de biodiesel de pinhão manso 112

Tabela 5.18 Valores isotópicos $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) de ésteres metílicos de diferentes fontes e os valores obtidos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ dos ésteres metílicos do biodiesel de pinhão manso 113

LISTA DE SIGLAS

AEAC	-	Etanol Etílico Anidro Combustível
AEHC	-	Etanol Etílico Hidratado Combustível
AE-EMRI	-	Analisador elementar acoplado a Espectrometria de Massas de Razão Isotópica
ANP	-	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
CENPES	-	Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello
CG	-	Cromatografia Gasosa
CG-C-EMRI	-	Cromatografia Gasosa Acoplada a Forno de Combustão e Espectrometria de Massas de Razão Isotópica
CG-DIC	-	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama
CG-EMRI	-	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas de Razão Isotópica
CL-EMRI	-	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas de Razão Isotópica
DQUIM	-	Divisão de Metrologia Química
DP	-	Desvio Padrão
DPR	-	Desvio Padrão Relativo
EI	-	*Electron Ionization*
EMBRAPA	-	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMRI	-	Espectrometria de Massas de Razão Isotópica
FAME	-	*Fatty Acid Methyl Esters*
IAEA	-	*International Atomic Energy Agency*
IEA	-	*International Energy Agency*
INMETRO	-	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INM	-	Institutos Nacionais de Metrologia
IRMM	-	*Institute for Reference Materials and Measurements* (Instituto Nacional de Metrologia da Bélgica)

IRMS	-	*Isotope Ratio Mass Spectrometry*
ISO	-	*International Organization for Standardization* (Organização Internacional de Normalização)
IUPAC	-	*International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
LABOR	-	Laboratório de Análise Orgânica
MR	-	Material de Referência
MRC	-	Material de Referência Certificado
NIST	-	*National Institute of Standards and Technology* (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, Estados Unidos)
PDB	-	*Pee Dee Belemnite*
PDP	-	Função de Densidade de Probabilidade
SI	-	Sistema Internacional de Unidades
SMOW	-	*Standard Mean Ocean Water*
EUA	-	Estados Unidos da América
VIM	-	Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais da Metrologia
VPDB	-	*Vienna Peedee Belemnite*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS

eV	-	Eletronvolt
m	-	Metro
min	-	Minutos
mBar	-	Milibar
mg	-	Miligramas
mL	-	Mililitro
m/m %	-	Razão mássica percentual
mm	-	Milímetros
mol/L	-	Mol por litro
n	-	Número de replicatas
ng	-	Nanograma
ppm	-	Partes por milhão
s	-	Segundos
µm	-	Micrometros
µL	-	Microlitro

SÍMBOLOS

a	-	Coeficiente angular
b	-	Coeficiente linear
BF_3	-	Trifluoreto de boro
CH_4	-	Metano
CO_2	-	Dióxido de carbono
ºC	-	Graus Celsius

ºC/min	-	Graus Celsius por minutos
H_2O	-	Água
NaCl	-	Cloreto de Sódio
k	-	Fator de abrangência
KOH	-	Hidróxido de potássio
m/z	-	Razão massa sobre carga
r^2	-	Coeficiente de determinação
N_2	-	Nitrogênio
NO	-	Óxido nítrico
O_2	-	Oxigênio
SO_2	-	Dióxido de enxofre
$\delta^{13}C$	-	Delta de Carbono 13
$\delta^{13}C_{VPDB}$	-	Delta de carbono 13 em relação à escala *Vienna Peedee Belemnite*
‰	-	Permil

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 26

1. Introdução 26

1.1. Motivação e Contexto 26

1.2. Objetivos Gerais 27

1.3 Objetivos Específicos 27

1.4. Estrutura da Tese 28

CAPÍTULO 2 29

2. Introdução 29

2.1 Isotopólogos 30

2.1.1 Notação δ (Delta) 31

2.1.2 Fracionamento Isotópico 33

2.1.3 Composição Isotópica do Carbono 34

2.2 Instrumental 35

2.2.1 Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica (CL-EMRI) 37

2.2.2 Analisador elementar acoplado ao Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica (AE-EMRI) 37

2.2.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de Razão Isotópica (CG-C-EMRI) 38

2.3 Metrologia Química 40

CAPÍTULO 3 43

3.1 Etanol Combustível 43

3.2 Experimental 46

3.2.1 Padrões, materiais de referência e solventes 46

3.2.2 Amostras 47

3.2.3 Equipamentos 48

3.2.4 Calibração do Gás de Referência (CO_2) 48

3.3 Métodos 48

3.3.1 Determinação da Pureza por CG-DIC 48

3.3.2 Método para calibração do gás de referência 49

3.3.2.1 Parâmetros do Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica 50

3.3.3 Calibração do sistema AE-EMRI 50

3.3.4 Análise do Etanol Combustível por CG-C-EMRI 51

3.3.5 Análise do Etanol Combustível por AE-EMRI 51

3.3.6 Métodos de Normalização 51

3.3.6.1 Curva de Calibração 51

3.3.6.2 *Single-Point* 52

3.3.6.3 *Two-Point* ou *Bracketing* 52

3.4 Análise Estatística 53

3.5 Resultados e Discussão 53

3.5.1 Otimização das condições cromatográficas para a calibraçao do gás de referência CO_2 53

3.5.2 Comparação dos resultados AE-EMRI e CG-C-EMRI para determinação de $\delta^{13}C_{VPDB}$ nas amostras de etanol combustível 58

3.6 Conclusões 65

CAPÍTULO 4 67

4. Introdução 67

4.1 Bioetanol 67

4.2 Objetivo 69

4.3 Experimental 70

4.3.1 Amostras 70

4.3.2 Padrões e materiais de referência 70

4.3.3 Equipamentos 70

4.3.4 Métodos 71

4.3.4.1 Calibração do Gás de Referência (CO_2) 71

4.3.4.2 Análise do etanol combustível por CG-C-EMRI 71

4.3.4.3 Parâmetros do EMRI 71

4.3.5 Método de Normalização 72

4.4 Análise Estatística 72

4.5 Resultados e Discussão 73

4.5.1 Análise exploratória do valor isotópico ($\delta^{13}C$) 73

4.5.2 Estatística Inferencial: O perfil isotópico do bioetanol no Brasil 76

4.5.3 Estimativa do intervalo do valor isotópico para novas amostras de bioetanol de cana-de-açúcar 80

4.6 Conclusões 82

CAPÍTULO 5 83

5.1 Biodiesel 83

5.2 Matérias-Primas 84

5.2.1 Pinhão manso 87

5.2.2. Óleo de Pinhão manso 88

5.3 Transesterificação 90

5.4 Ésteres Metílicos 91

5.4.1 Assinatura Isotópica dos Ésteres Metílicos 92

5.5 Experimental 94

5.5.1 Reagentes 94

5.5.2 Amostras 94

5.5.3 Equipamentos 95

5.5.4 Obtenção dos óleos de pinhão manso por extração com solvente 96

5.5.4.1 Análise dos Brancos 96

5.5.4.2 Extração do óleo de pinhão manso 96

5.5.5 Biodiesel a partir da transesterificação a partir do óleo de pinhão manso 97

5.5.6 Métodos 97

5.5.6.1 Análise do teor de ésteres metílicos do biodiesel obtido a partir da transesterificação a partir do óleo de pinhão manso por CG-EM 97

5.5.6.1.1 Validação do método do teor de ésteres metílicos do biodiesel por CG-EM 98

5.5.6.2 Calibração do sistema AE-EMRI 98

5.5.6.3 Análise isotópica do óleo de pinhão manso de diferentes origens geográficas por AE-EMRI 99

5.5.6.4 Análises dos ésteres metílicos do biodiesel por CG-C-EMRI 99

5.5.6.5 Parâmetros do Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica 99

5.6 Resultados e Discussão 99

5.6.1 Extração do óleo de pinhão manso 99

5.6.2 Transesterificação do óleo de pinhão manso 101

5.6.3 Análise dos ésteres metílicos do biodiesel de pinhão manso por CG-EM 102

5.6.4 Avaliação da assinatura isotópica do óleo de pinhão manso de diferentes origens geográficas por AE-EMRI 106

5.6.5 Avaliação da assinatura isotópica dos ésteres metílicos do biodiesel de pinhão manso de diferentes origens geográficas por CG-C-EMRI 109

5.7 Conclusões 114

CAPÍTULO 6 116

6.1 Conclusões Gerais 116

6.2 Perspectivas Futuras 117

CAPÍTULO 7 118

7.1 Referências 118

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1 Introdução

1.1 Motivação e Contexto

A utilização de biocombustíveis é na atualidade uma das mais importantes alternativas para os combustíveis derivados do petróleo. Em função disso, o estabelecimento de padrões de qualidade aceitos internacionalmente e a aplicação de metodologias analíticas validadas devem tornar um processo contínuo para se garantir a qualidade desses biocombustíveis.

Diante disso, a certificação representa uma forma de atestar, com confiança e credibilidade, que o processo de produção do biocombustível brasileiro segue requisitos mínimos estabelecidos por normas e regulamentos. A determinação da origem dos biocombustíveis poderá, dentro deste contexto, auxiliar na eliminação de barreiras técnicas constituindo-se numa ferramenta importante para o governo.

Dentre os métodos analíticos empregados para certificar a origem de diferentes matrizes, a determinação da razão isotópica por meio da técnica de Espectrometria de Massas de Razão Isotópica (EMRI) se mostra altamente promissora, garantindo confiabilidade aos resultados. A EMRI é uma técnica bastante utilizada em várias áreas como: hidrologia, geoquímica do petróleo, estudos ambientais, alimentos, dentre muitas outras e baseia-se na medida da abundância relativa de isótopos estáveis de determinado elemento químico em uma dada amostra ou molécula específica. A partir destas mudanças, podem-se inferir conclusões sobre o estudo de interesse. Logo, esta técnica de análise é uma ferramenta importante na distinção de fontes que contribuem na composição da matéria orgânica.

Dentre os muitos compostos orgânicos que podem ter a origem identificada pela EMRI temos o etanol combustível e o biodiesel. Nesse enfoque, o trabalho teve como proposta traçar o perfil da distribuição isotópica de carbono do etanol combustível de cana-de-açúcar no Brasil e a determinação da razão isotópica de carbono da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel e dos ésteres metílicos do biodiesel de forma a garantir a rastreabilidade e a confiabilidade às medições isotópicas de carbono ($\delta^{13}C$) desses biocombustíveis.

1.2 Objetivos Gerais

O trabalho teve como objetivo geral a avaliação da assinatura isotópica de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$) de biocombustíveis e sua aplicação com ênfase na diferenciação das matérias-primas utilizadas na produção dos mesmos através da cromatografia à gás acoplada à forno de combustão e espectrometria de massas de razão isotópica (CG-C-EMRI), buscando garantir a qualidade dos biocombustíveis, a confiabilidade e rastreabilidade as medições isotópicas.

Dessa forma, foram tidos como objetivos frente à proposta de tese, a avaliação da assinatura isotópica de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$) do etanol combustível produzido a partir de diferentes fontes de matérias-primas, a determinação da razão isotópica de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$) do óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas)* obtido de sementes de diferentes regiões do Brasil e a avaliação isotópica dos ésteres metílicos do biodiesel obtido a partir da transesterificação do óleo de pinhão manso.

1.3 Objetivos Específicos

- ✓ Seleção das amostras de etanol combustível produzido a partir de diferentes matérias-primas oriundas de diferentes regiões do Brasil e de outros países;
- ✓ Estudo da influência de diferentes métodos de calibração e normalização na exatidão das medidas isotópicas de carbono ($\delta^{13}C$) em amostras de etanol combustível por CG-C-EMRI;
- ✓ Avaliação do perfil da distribuição isotópica de carbono ($\delta^{13}C$) de bioetanol de cana-de-açúcar no Brasil usando ferramentas estatísticas;
- ✓ Determinação da razão isotópica de carbono ($\delta^{13}C$) do óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) obtido de sementes oriundas de diferentes regiões do Brasil;
- ✓ Determinação do valor isotópico de carbono ($\delta^{13}C$) dos ésteres metílicos do biodiesel obtido a partir da transesterificação do óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*).

1.4 Estrutura da Tese

Esta tese está dividida nos seguintes capítulos:

Primeiro, a Introdução que visa apresentar de forma sucinta a visão geral e a motivação sobre o tema descrevendo seus principais objetivos e a importância do estudo.

O segundo está dividido em partes e aborda os princípios da técnica de EMRI e suas aplicações.

O terceiro e quarto apresentam os estudos referentes ao etanol combustível, sendo eles o estudo da influência de diferentes métodos de calibração e normalização na exatidão das medições de carbono ($\delta^{13}C$) do etanol combustível por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas de razão isotópica (CG-C-EMRI) e a avaliação do perfil da distribuição isotópica de carbono ($\delta^{13}C$) de bioetanol de cana-de-açúcar no Brasil usando ferramentas estatísticas.

O quinto capítulo refere-se aos estudos referentes ao biodiesel, visando à avaliação da assinatura isotópica de carbono ($\delta^{13}C$) do óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) de diferentes regiões do Brasil e dos ésteres metílicos do biodiesel produzido a partir da transesterificação do óleo de pinhão manso.

O sexto capítulo é constituído pelas conclusões gerais e as perspectivas de trabalhos futuros. O sétimo e último apresenta as referências bibliográficas.

CAPÍTULO 2

Espectrometria de Massas de Razão Isotópica – Fundamentação Teórica

2 Introdução

A Espectrometria de Massas de Razão Isotópica - EMRI (*Isotope Ratio Mass Spectrometry - IRMS*) é uma técnica cujas aplicações se encontram em crescimento em diversas áreas como arqueologia, medicina, geologia, biologia, geoquímica do petróleo, estudos ambientais, controle e inspeção de alimentos, química forense, dentre outras (BENSON *et al*, 2006; SESSIONS, 2006; MEIER- AUGENSTEIN, 1999).

Alguns exemplos que podem ser citados são: a detecção de adulteração de méis comerciais (PADOVAN *et al*, 2003), a determinação da origem botânica de álcoois presentes em vinho, assim como a determinação da origem regional de vinhos (GIMÉNEZ-MIRALES; SALAZAR; SOLANA, 1999), o teor de etanol em vinhos (SPITZKE; FAUHL-HASSEK, 2010), a origem do etanol de acordo com os processos de obtenção (ZYAKUN *et al*, 2000), a análise de poluentes ambientais, como Compostos Orgânicos Voláteis - COV (VON ECKSTAEDT *et al*, 2011; GIEBEL; SWART; RIEMER, 2010), a análise forense (BENSON *et al*, 2009; CAWLEY *et al*, 2009; MUNTON *et al*, 2011), *doping* (AGUILERA; HATTON; CATLIN, 2002; MUNTON *et al*, 2012; BAUME *et al*, 2006) etanol em água (BRICHE, 2000), a autenticidade de gêneros alimentícios tais como a tequila (AGUILAR-CISNEROS *et al*, 2002), sucos de frutas (GUILLOU *et al*, 1999), a determinação de fontes de contaminação por gasolina (SMALLWOOD; PHILP; ALLEN, 2002), autenticação e origem geográfica de óleos (KELLY *et al*, 1997; ALONSO-SALCES *et al* , 2010; SCHIPILLITI *et al*, 2012; SPANGENBERG; DIONISI, 2001), dentre outras.

Os isótopos de um elemento químico são caracterizados por terem o mesmo número atômico (prótons), mas diferentes números de nêutrons. De acordo com a química clássica, as características dos isótopos são iguais. Esta afirmação também é válida no caso de moléculas de um mesmo composto químico. Porém, se uma medida tem alta sensibilidade, como é o caso da EMRI, pode-se observar pequenas diferenças tanto no comportamento químico como no comportamento físico de moléculas do mesmo composto, mas com composições isotópicas diferentes.

Isso é possível somente graças à diferenciação da composição isotópica de um determinado composto em relação a outro, que ocorre, geralmente, devido aos diferentes processos físicos e químicos aos quais foram submetidos (BENSON *et al*, 2006; SESSIONS, 2006; MEIER- AUGENSTEIN, 1999).

Cada elemento tem um ou mais isótopos estáveis (^{13}C, ^{15}N, ^{17}O, ^{18}O, ^{33}S, ^{34}S e ^{2}H) com abundância natural. Na Tabela 2.1 são apresentadas as abundâncias relativas de isótopos comumente analisados por EMRI.

Tabela 2.1 Abundâncias relativas de isótopos comumente analisados por EMRI.

Elemento	Isótopo	Abundância Relativa (%)
Hidrogênio	^{1}H ^{2}H	99,984 0,156
Carbono	^{12}C ^{13}C	98,892 1,108
Nitrogênio	^{14}N ^{15}N	99,635 0,365
Oxigênio	^{16}O ^{17}O ^{18}O	99,759 0,037 0,204
Enxofre	^{32}S ^{33}S ^{34}S ^{36}S	95,02 0,76 4,22 0,014

BENSON *et al*, 2006.

2.1 Isotopólogos

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), isotopólogos são moléculas que diferem entre si apenas na composição isotópica (SHARP, 2007). De acordo com essa definição, por exemplo, do CO_2, os isotopólogos são $^{12}C^{16}O_2$ de *m/z* 44; $^{12}C^{16}O^{17}O$ e $^{13}C^{16}O_2$ de *m/z* 45; $^{12}C^{16}O^{18}O$, $^{12}C^{17}O_2$ e $^{13}C^{17}O^{16}O$ de *m/z* 46.

Logo, para que as medições das razões isotópicas $^{13}C/^{12}C$ numa amostra sejam corretas, é fundamental levar em conta as contribuições dos isotopólogos.

Os *softwares* que processam os dados provenientes do EMRI são programados e introduzem automaticamente os fatores de correção. Quando se analisa CO_2, por exemplo, pode haver contribuição, para a mesma massa, de outras espécies isotópicas que não a de interesse, pelo que terá que ser feita uma correção. Por exemplo, para *m/z* 45 existem duas espécies com esta massa nominal $^{13}C^{16}O_2$ (de interesse) $^{12}C^{17}O^{16}O$ (que não tem interesse) e então a razão *m/z* deve ser corrigida. A correção mais comum para a determinação de $\delta^{13}C$ foi desenvolvida por Craig (1957), um algoritmo através da equação 2.1:

$$\delta^{13}C = 1{,}0676\ \delta\,(44/45) - 0{,}0338\ \delta^{18}O$$

Equação 2.1

2.1.1 Notação δ (Delta)

Os EMRI trabalham, geralmente, com amostras no estado gasoso ou convertidas em um gás conhecido durante a análise. Deste modo, devem ser preparadas de maneira que o resultado seja um gás que represente a composição isotópica do elemento que se deseja analisar, permitindo separar as moléculas ionizadas, com diferentes massas isotópicas, de um mesmo composto e medir suas abundâncias relativas (BENSON *et al*, 2006; SESSIONS, 2006).

A maneira pela qual, geralmente, o valor de uma medida isotópica é expressa em relação a um padrão internacional e de composição isotópica conhecida é através da notação δ, dada em partes por mil (‰) pela Equação 2.2:

$$\delta^{13}\mathrm{C} = \delta^{13/12}\mathrm{C} = \frac{R_{amostra}}{R_{padrão}} - 1 = \frac{R_{amostra} - R_{padrão}}{R_{padrão}}$$

Equação 2.2

Onde: $R_{amostra}$ é a razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ da amostra e $R_{padrão}$ é a razão $^{13}C/^{12}C$ isotópica do padrão.

Para normalizar os resultados de valores isotópicos, foi necessário estabelecer uma escala internacional. Os valores isotópicos medidos são relativos a um padrão utilizado, referindo-se à diferença entre a amostra e o padrão adotado. O padrão universal, utilizado como zero *point* para a composição isotópica de carbono é o PDB (*Pee Dee Belemnite*), que consiste em um fóssil composto de carbonato de cálcio marinho de uma *belemnite* do período Cretácio (*Belemnitella americana*) da formação *Pee Dee*, da Carolina do Sul, o SMOW (*Standard Mean Ocean Water*) para oxigênio e deutério e o CDT (*Canion Diablo Troilite*) para enxofre e ar atmosférico para nitrogênio.

Com relação ao carbono, esse padrão de referência internacional, o PDB, esgotou e foi substituído pelo *Vienna Pee Dee Belemnite* (VPDB), um padrão secundário para a determinação da razão isotópica $^{13}C/^{12}C$. Por razões práticas, é mais conveniente adotar um padrão de trabalho no laboratório, calibrado segundo este padrão de valor certificado, o VPDB. Todos os padrões isotópicos são calibrados relativamente a estes padrões de referência que são denominados como zero *point* (valores de δ = 0 ‰).

A Tabela 2.2 mostra os padrões internacionais para alguns elementos analisados por EMRI.

Tabela 2.2 Padrões internacionais para alguns elementos analisados por EMRI.

Padrão	Razão Isotópica do Material de Referência (‰)
Pee Dee Belemnite[a]	$^{12}C/^{13}C$ = 0,011237 $^{18}O/^{16}O$ = 0,0020671
Nitrogênio Atmosférico[b]	$^{15}N/^{14}N$ = 0,0036765
Água (SMOW)[c]	$^{18}O/^{16}O$ = 0,0020052
CDT[d]	$^{34}S/^{32}S$ = 0,0450045

[a]para o carbono o padrão é a rocha do fóssil *Belemnitella* americana da formação *Pee Dee Belemite* (PDB) da Carolina do Sul - EUA; [b]nitrogênio tem como padrão gás N_2 atmosférico; SMOW (Standard Mean Ocean Water); [d]para o enxofre é o mineral *Troilito* da cratera do meteorito do "*Canyon Diablo*" (CDT), Arizona, EUA (BENSON *et al*, 2006).

2.1.2 Fracionamento Isotópico

As variações isotópicas de um elemento não são constantes devido as variações naturais que ocorrem nos diversos processos físico-químicos, os quais ocasionam fracionamento isotópico (BENSON *et al*, 2006). O fracionamento isotópico, também conhecido como discriminação, é denominado como a variação nas razões de abundância dos isótopos como consequência das diferentes propriedades físicas e químicas do isótopo mais leve relativamente ao isótopo mais pesado, para um dado elemento. Valores de $\delta^{13}C$ positivos representam um enriquecimento do isótopo pesado em relação ao padrão internacional, enquanto que valores de $\delta^{13}C$ negativos representam uma diminuição da quantidade do isótopo pesado (SESSIONS, 2006; KLEIN, 1982).

A variabilidade também pode ocorrer como uma mudança na composição isotópica pela transição de um componente de um estado físico para outro ou pela transformação deste em outro: CO_2 em carbono orgânico da planta, por exemplo. É importante ressaltar que a magnitude do fracionamento isotópico na natureza também é afetada pelas diferenças regionais, tais como umidade, temperatura, ventos, dentre outras (BREÁS; RENIERO; SERRINI, 1994).

Através da composição do isótopo estável de carbono na matéria orgânica é possível identificar as fontes de carbono como também a discriminação (fracionamento) entre ^{12}C e ^{13}C durante a fixação de CO_2 na fotossíntese (KUBÁSEK; URBAN; SANTRUCEK, 2013).

A Figura 2.1 ilustra alguns exemplos típicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ naturais agrupados de acordo com a origem ao longo da escala de abundância natural do $\delta^{13}C$.

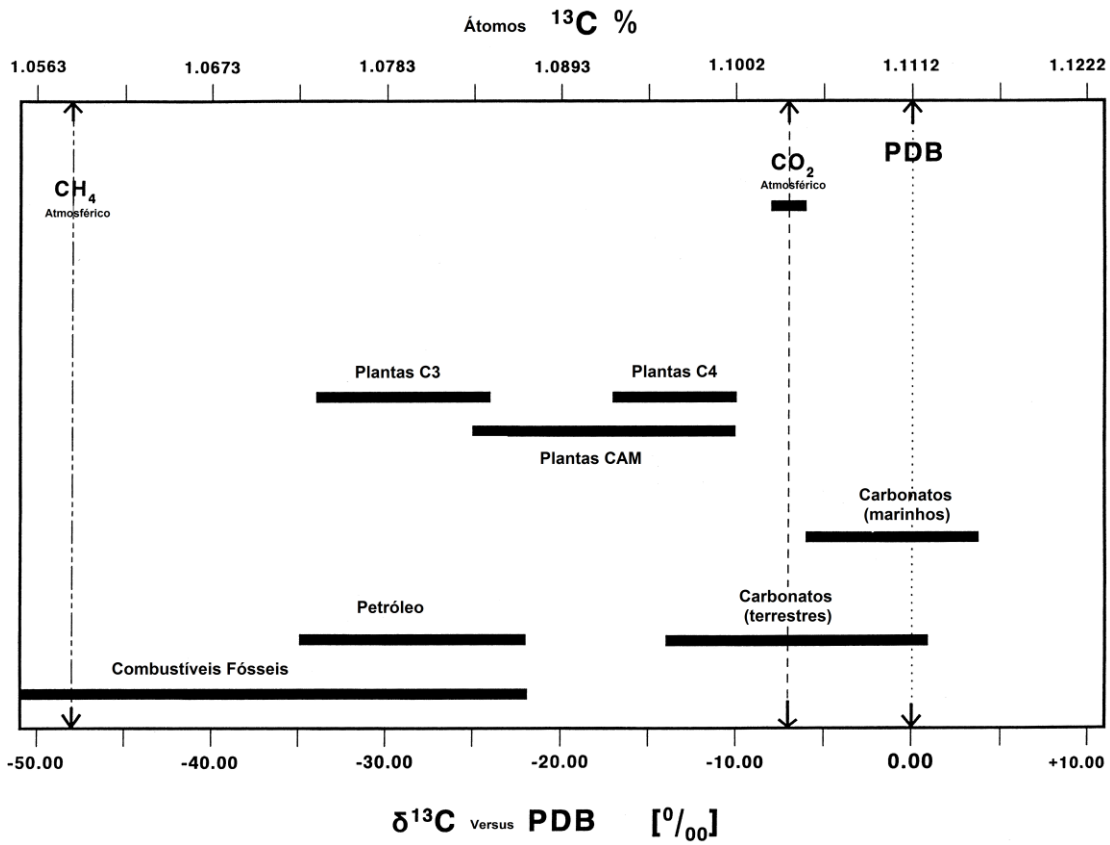

Figura 2.1 Exemplos de variação isotópica natural de $\delta^{13}C$ agrupados de acordo com a origem ao longo da escala de abundância natural do $\delta^{13}C$ (MEIER- AUGENSTEIN, 1999).

2.1.3 Composição Isotópica do Carbono

No tecido das plantas, a principal fonte de variação da relação $^{13}C/^{12}C$ está nos diferentes mecanismos de fixação do dióxido de carbono (CO_2) durante a fotossíntese que pode ocorrer por dois caminhos que diferem quanto ao número de carbonos no primeiro composto intermediário formado, que são conhecidos como ciclo de Calvin-Benson (C_3) e o de Hatch-Slack (C_4). A base de variação isotópica em plantas resulta do fracionamento isotópico durante a fotossíntese.

As plantas terrestres podem ser divididas em três grupos fotossintéticos, cada um com seu padrão de fracionamento isotópico específico: C_3, C_4 e CAM (metabolismo ácido das crassuláceas), sendo que os metabolismos C_3 e C_4 são mais abundantes (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989).

As plantas com via fotossintética C_3 (como exemplo, uva, arroz, cevada, etc) reduzem o CO_2 para fosfoglicerato (composto de três carbonos) através da enzima ribulose-1,5-difosfato carboxilase (RuBP-carboxilase). Esta enzima discrimina o $^{13}CO_2$, resultando em valores de $\delta^{13}C$ relativamente baixos, entre -32 e -23 ‰.

As plantas com via fotossintética C_4 (por exemplo, cana de açúcar, milho, etc) reduz o CO_2 a ácido aspártico ou málico, (com quatro átomos de carbono nas moléculas), através da enzima PEP-carboxilase (fosfoenolpiruvato carboxilase). Esta enzima não discrimina tanto o $^{13}CO_2$ como a RuBP-carboxilase. Desta forma plantas C_4 têm valores de $\delta^{13}C$ relativamente mais altos. Tais valores variam entre -15 a -9 ‰. Assim, as espécies C_3 e C_4 possuem valores distintos, que não se sobrepõem, sendo possível, portanto, a utilização desses valores na identificação da fonte de carbono. (GUILLOU *et al*, 1999).

2.2 Instrumental

Os espectrômetros de massas usualmente utilizados como os quadrupolos, *ion traps* e *time-of-flight* (TOF ou tempo de voo) não possuem sensibilidade ou precisão adequada para detectar sutis diferenças nas abundâncias dos isótopos, e assim, as medições dos isótopos naturais requerem um equipamento com analisadores do tipo setor magnético, conhecido como EMRI (ZELAND; JACKSON, 2009).

Em contraste com os espectrômetros de massas convencionais que fornecem informações estruturais pela varredura de uma ampla faixa de massas (verificando a presença de vários íons fragmentados característicos), os equipamentos de EMRI medem abundâncias isotópicas com alta precisão e menor flexibilidade na discriminação de massas (MEIER-AUGENSTEIN, 1999). O campo magnético do espectrômetro de massas tem alta sensibilidade, cerca de um íon detectado por 1000 moléculas, o que o diferencia da técnica de espectrometria de massas usual.

O espectrômetro de massas de razão isotópica foi inicialmente desenvolvido por Nier em 1940 (De BIEVRE; LAETER; PEISER, 1992), com a função de medir, de forma exata, determinadas massas sequencialmente na amostra e na referência.

Nestes equipamentos as amostras a serem analisadas são inseridas por meio de um sistema de introdução na fonte de ionização, onde são ionizadas em uma fonte de Ionização por elétrons (*Electron Ionization – EI)* e aceleradas a vários kV (quilovolts) (MEIER-AUGENSTEIN,1999). Na separação isotópica do CO_2, por exemplo, tem-se os íons de *m/z* 45/44 que produzem a razão $^{13}C/^{12}C$ do CO_2 (Figura 2.2).

Após passar pelo campo magnético os íons separados são detectados por coletores de íons do tipo *Faraday*, os quais são posicionados ao longo do plano focal do EMRI (SOOKG, 2009). A Figura 2.3 demonstra o esquema de um EMRI incluindo a fonte de íons, o analisador magnético e o sistema de detecção.

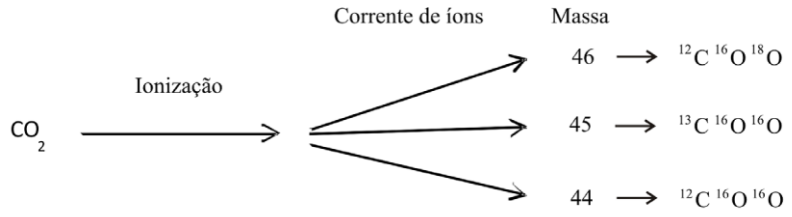

Figura 2.2 Diagrama com a representação da separação isotópica do CO_2.

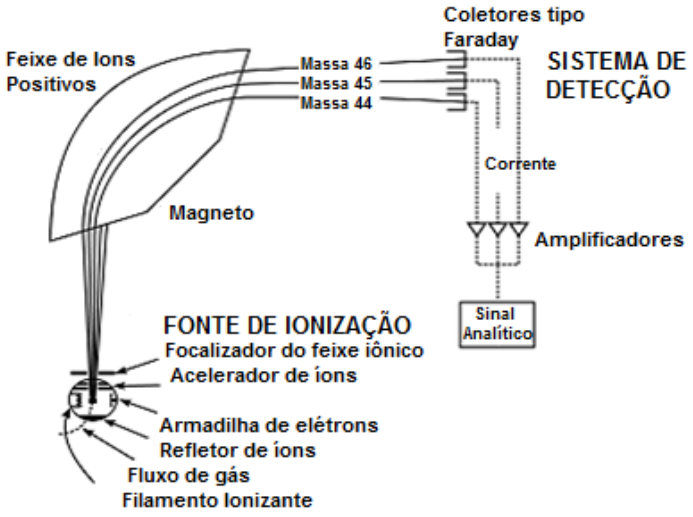

Figura 2.3 Esquema do Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica – EMRI (SOOKG, 2009).

Existem cinco partes principais no espectrômetro de massas de razão isotópica: sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas, detector coletores de íons do tipo *Faraday* e o sistema de aquisição de dados.

Diferentes interfaces são usadas para introdução de amostra no EMRI, como o cromatógrafo à líquido e as duas mais comuns: o analisador elementar (AE-EMRI) e o cromatógrafo à gás (CG-C-EMRI) (ZELAND; JACKSON, 2009; AI; SUN; DONG, 2014; CABAÑERO; RECIO; RUPÉREZ, 2008; van LEEUWEN, 2014).

2.2.1 Cromatografia à Líquido acoplada ao Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica (CL-EMRI)

A Figura 2.4 mostra o sistema hifenado onde temos um cromatógrafo à líquido acoplado a espectrômetro de massas de razão isotópica (CL-EMRI). A oxidação da amostra é feita em fase líquida e somente depois o CO_2 é separado desta fase para a análise isotópica. O reagente de oxidação consiste em duas soluções, um agente oxidante e um catalisador. Ambos são bombeados separadamente e adicionados a fase móvel. Os compostos que eluem da coluna do cromatógrafo à líquido são oxidados a CO_2 nessa mistura ao passarem pelo reator. O CO_2 é removido da fase líquida em uma unidade de desgaseificação e então direcionado ao EMRI (ZELAND; JACKSON, 2009).

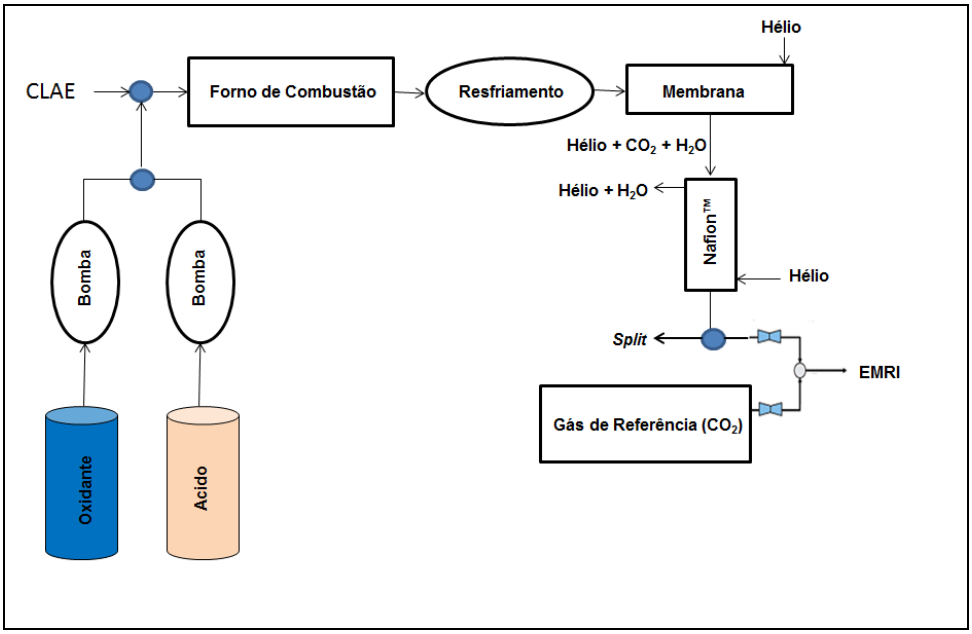

Figura 2.4 Esquema do sistema CL-EMRI (KELLY; RHODE, 2002).

2.2.2 Analisador elementar acoplado ao Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica (AE-EMRI)

O analisador elementar (*Elemental Analyzer* - EA) acoplado ao espectrômetro de massas de razão isotópica (AE-EMRI) é uma técnica que permite determinar os teores isotópicos dos elementos constituintes da amostra na sua totalidade.

A fim de determinar a média das razões isotópicas para não voláteis líquidos ou sólidos, a amostra é pesada e colocada numa cápsula de estanho ou de prata, que é submetida a um forno de combustão com temperatura em torno de 1020 °C através de um amostrador automático.

A amostra e a cápsula fundem numa atmosfera temporariamente enriquecida em oxigênio. Na análise da razão isotópica de carbono – aplicação mais comum – os produtos de oxidação passam pelo tubo de redução, onde os óxidos de nitrogênio (NO e N_2O) são reduzidos a N_2 e o O_2 em excesso é removido.

Os gases resultantes, CO_2, N_2, SO_2 e H_2O passam através de um filtro de perclorato de magnésio para remoção da água e são separados através de uma coluna capilar. Em seguida passam pelo detector e por fim são direcionados ao EMRI onde são medidas as razões isotópicas, conforme apresentado na Figura 2.5 (KELLY; RHODES, 2002).

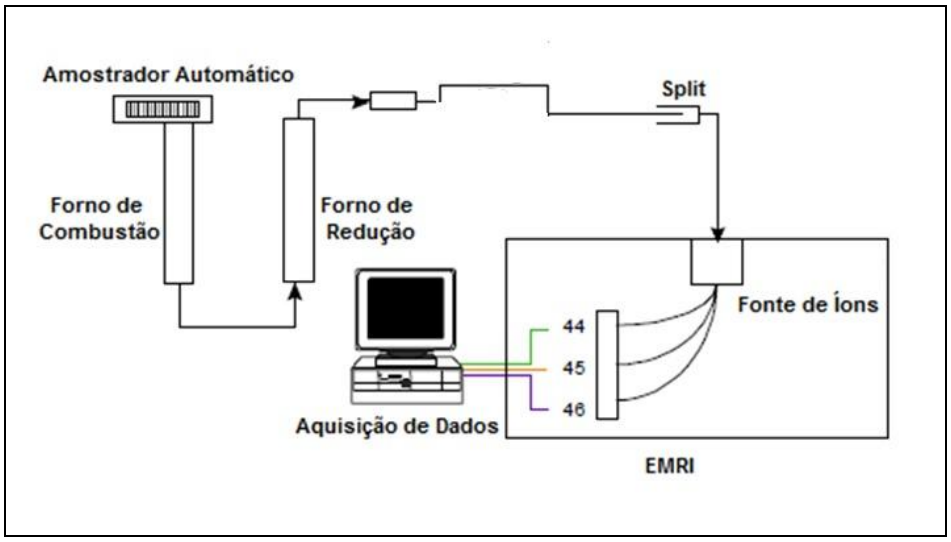

Figura 2.5 Esquema do sistema AE-EMRI (KELLY; RHODE, 2002).

2.2.3 Cromatografia à Gás acoplada a Forno de Combustão e Espectrometria de Massas de Razão Isotópica (CG-C-EMRI)

A cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e à espectrometria de massas de razão isotópica (CG-C-EMRI) foi introduzida por Sano *et al* (1976) e por Matthews e Hayes (1978). Esta técnica de análise é uma ferramenta importante na distinção de fontes que contribuem na composição da matéria orgânica (SESSIONS, 2006).

A amostra a ser analisada é introduzida num cromatógrafo à gás onde é separada em diversos compostos que sofrem combustão num forno de oxidação. Os gases resultantes da combustão passam por um forno de redução que tem a função de eliminar compostos nitrogenados, evitando a interferência de moléculas de mesma massa molecular que as de CO_2 nos coletores. O CO_2 obtido de cada componente da amostra tem sua razão $^{13}C/^{12}C$ analisada através das massas *m/z* 44 ($^{12}CO_2$), *m/z* 45 ($^{13}CO_2$ e $^{12}C^{17}O^{16}O$) e *m/z* 46 ($^{12}C^{18}O^{16}O$). Esta razão é comparada a um CO_2 de referência de valor $\delta^{13}C$ conhecido, em relação ao padrão VPDB para então ser determinada a composição isotópica de cada componente da amostra.

Os gases resultantes da combustão entram na fonte de íons onde são submetidos à ionização por elétrons. Após a formação dos íons, os mesmos são extraídos da câmera de ionização e acelerados por voltagem de aceleração. Finalmente, os íons de interesse, com relação à razão massa sobre carga (*m/z*) iguais a 44, 45 e 46 (exemplo do carbono) são separados pela aplicação de um campo magnético, já que apresentam diferentes massas e geralmente o mesmo estado de carga tem suas trajetórias desviadas pelo campo magnético de forma diferencial, permitindo serem detectados em coletores (ou copos) de *Faraday* e os respectivos sinais são amplificados e registrados na forma de um sinal. A Figura 2.6 mostra como ocorre o processo de aquisição descrito.

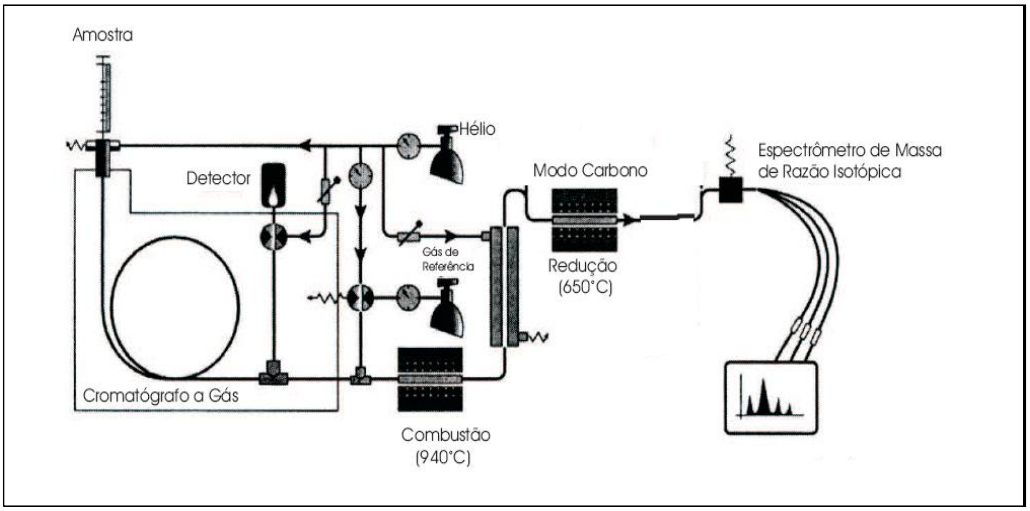

Figura 2.6 Esquema do EMRI acoplado ao cromatógrafo à gás e interface com forno de combustão (CG-C-EMRI) (MEIER-AUGENSTEIN, 1999).

As análises por CG-C-EMRI apresentam algumas limitações: a dificuldade de se obter padrões de referência que atendam a esta técnica, visto que a maioria dos padrões são certificados por meio da técnica AE-EMRI e o uso de padrões de calibração com diferentes propriedades químicas e na faixa de valores isotópicos dos compostos a serem analisados. Tais efeitos são menos pronunciados no sistema AE-EMRI, o que torna a comparação dos resultados obtidos pelas duas técnicas uma abordagem importante para determinar a precisão, a rastreabilidade e o desempenho do sistema CG-C-EMRI.

O sistema AE-EMRI tende a ser mais robusto e preciso do que o sistema GC-C-EMRI devido aos resultados serem rastreáveis ao VPDB via padrão de referência internacional de um óleo mineral, o NBS-22 (SCHIMMELMANN, 2014), e com isso essa técnica pode ser usada para comparar e validar os resultados obtidos por CG-C-EMRI, tendo os seus valores tidos como os valores de referência (SERRA *et al*, 2007).

Em geral, os sistemas de CG-C-EMRI são calibrados por meio do AE-EMRI utilizando uma referência externa, porém é essencial que sejam analisados um padrão isotópico por CG-C-EMRI para que os resultados possam ser comparáveis aos atribuídos por AE-EMRI (BROGIO, 2009).

No entanto, para os laboratórios equipados somente com o sistema de CG-C-EMRI, a falta de um sistema AE-EMRI impõe algumas restrições para a exatidão e rastreabilidade dos resultados isotópicos, que podem ser supridas com o uso de materiais de referência certificados (MRC) adequados (BROGIO, 2009) e com a aplicação de métodos de normalização.

2.3 Metrologia Química

O acoplamento de cromatógrafos ao EMRI, com uma interface de combustão (CG-C-EMRI) para determinação das razões isotópicas $^{13}C/^{12}C$ é relativamente recente e apresenta a vantagem de fornecer valores $\delta^{13}C$ dos diferentes componentes de misturas complexas. Contudo, ainda depara-se com a dificuldade de obtenção de Materiais de Referência Certificados (MRC) para a validação dos métodos e calibração do sistema.

O MRC é um material de referência, acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, e certificados por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores das propriedades são expressos, e cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido (VIM, 2012).

A função do material de referência certificado é melhorar a ciência da medição e constitui uma das principais ferramentas para a garantia da rastreabilidade nas medições químicas (TAYLOR, 1993; De BIÈVRE, 2011).

Alguns Institutos Nacionais de Metrologia (INM) produzem MRC certificados para os valores de $^{12}C/^{13}C$, rastreáveis ao sistema Sistema Internacional de Unidades (SI), como o *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM, 2009), *International Atomic Energy Agency* – IAEA (IAEA, 1995) e a Universidade de Indiana, em Bloomington, EUA (SCHIMMELMANN, 2014), porém, ainda assim existe a carência de MRC adequados às análises por CG-C-EMRI (De BIÈVRE, 2006; VOGL, 2013; De BIÈVRE,1993).

Devido à falta de MRC disponíveis para o sistema CG-C-EMRI, a calibração normalmente é realizada através do sistema AE-EMRI utilizando um padrão externo. No caso de laboratórios equipados somente com o sistema CG-C-EMRI, faz-se necessário a calibração de padrões secundários para cada tipo de determinação (PANETTA; JAHREN, 2011).

No Brasil, a preocupação com a qualidade das medições químicas vem sendo crescente em vários setores. Os problemas atuais que envolvem saúde, meio ambiente, desenvolvimento e controle de produtos industriais e de novos materiais demandam um número cada vez maior de amostras em níveis de concentração cada vez menores, destacando assim, a crescente necessidade de garantia e controle de qualidade das medições químicas e, com isso, a necessidade de utilização de materiais de referência certificados e da disseminação dos conceitos de metrologia química no país.

Segundo o Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais da Metrologia (VIM), “a metrologia, ou ciência da medição, abrange todos os aspectos teóricos e práticos relativos às medições, qualquer que seja a incerteza, em quaisquer campos da ciência ou da tecnologia” (VIM, 2012).

O interesse por esta nova área interdisciplinar da Química se deve principalmente às dificuldades associadas ao estudo e à aplicação do conceito de

rastreabilidade das análises químicas, a padrões reconhecidos e aceitos internacionalmente, conforme determinado por organismos de padronização ligados a qualidade como a ISO (*International Organization for Standardization*).

O provimento da rastreabilidade às medições químicas aumenta a confiabilidade das medições realizadas nas diversas análises. O Sistema Internacional de Unidades (SI) ainda é muito pouco utilizado no dia a dia dos laboratórios, o que dificulta muitas vezes a rastreabilidade direta das medições ao mol, que é proposta através de medições químicas baseadas em métodos primários e materiais de referência certificados.

A realização de medições confiáveis utilizando-se procedimentos validados é de extrema importância, visto que nos últimos anos, cada vez mais normas nacionais e internacionais têm sido criadas, e/ou revisadas, com o intuito de assegurar um sistema de qualidade aplicado a estas medições, como por exemplo, a área de biocombustíveis, onde existe a preocupação em relação a substituição dos combustíveis fósseis por matrizes renováveis, uma vez que a utilização de biocombustíveis de má qualidade trará implicações diretas para o meio ambiente e, consequentemente, à saúde humana.

A EMRI permite assegurar a qualidade dos biocombustíveis através da determinação da razão isotópica dos mesmos dando consistência à cadeia metrológica fornecendo resultados exatos e precisos associados a baixos valores de incerteza de medição. Em função disso, a metrologia torna-se essencial, visto que ela abrange todos os aspectos teóricos e práticos relativos às medições (VIM, 2012).

Estas ações estão ligadas diretamente ao Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) que tem a missão de prover confiança à sociedade brasileira nas medições e nos produtos, através da metrologia e da avaliação da conformidade, promovendo a harmonização das relações de consumo, a inovação e a competitividade do País (INMETRO, 2015).

CAPÍTULO 3

Estudo da influência de diferentes métodos de calibração e normalização na exatidão das medições do valor isotópico de carbono ($\delta^{13}C$) em amostras de etanol combustível por CG-C-EMRI

3 Introdução

3.1 Etanol Combustível

Segundo a *International Energy Agency* (IEA, 2014), o desafio de alterar as fontes energéticas que movem a economia mundial, onde o petróleo e o gás natural representam mais de 50 % da matriz energética, tornou-se uma necessidade global e a inserção de biocombustíveis tem contribuído para a diversificação na utilização de fontes renováveis (KUMAR; SINGH; PRASAD, 2010). O etanol, do ponto de vista econômico e ambiental, dentre todos os biocombustíveis viáveis, é o que tem maior chance de contribuir de forma substancial à matriz energética em diversos países, principalmente se produzido a partir da cana-de-açúcar.

O verdadeiro diferencial do etanol como combustível está no crescimento da lavoura de cana-de-açúcar, que absorve o gás carbônico em quantidade suficiente para deixar todo o ciclo produtivo de etanol com emissões até 90 % menores que a gasolina (TRIANA, 2011).

O etanol produzido a partir de várias fontes, tais como cana-de-açúcar, beterraba, milho, trigo e arroz é denominado bioetanol (BNDES, 2008). O Brasil produz etanol principalmente a partir de cana-de-açúcar (FREITAS; KANEKO, 2011), enquanto que em outros países, como nos EUA e na França, o etanol é produzido a partir do milho e da beterraba, respectivamente (CHUM *et al*, 2014).

O bioetanol é utilizado como combustível em motores de combustão interna de duas maneiras: em misturas de gasolina e etanol anidro ou como etanol parcialmente hidratado. A regulação é estabelecida pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) e também pelas Leis nº 9.478/97 e nº 9.847/99, e é restrita a: especificar a qualidade do etanol combustível seja aquele misturado com a gasolina (anidro) ou aquele revendido diretamente nos postos de abastecimento (hidratado) e regular as atividades de distribuição e revenda de

combustíveis. No Brasil, as especificações, que devem ser atendidas pelos produtores e respeitadas por toda a cadeia de comercialização, são definidas pela Portaria ANP 309/2001 (ANP, 2001), para a gasolina com etanol anidro, e pela Resolução ANP 36/2005 (ANP, 2005) para o etanol anidro e hidratado, denominados, respectivamente, Álcool Etílico Anidro Combustível (AEAC) e Álcool Etílico Hidratado Combustível (AEHC), na legislação brasileira.

A técnica de EMRI tem sido utilizada na certificação da origem e também para detectar a adulteração em vários produtos, assim como na certificação do bioetanol, onde através da medição dos isótopos estáveis é possível a identificação da sua origem geográfica e também das matérias-primas específicas utilizadas na produção do mesmo, como demonstrado recentemente para o bioetanol de cana-de-açúcar no Brasil (NEVES *et al*, 2015).

Através dessa técnica é possível determinar a razão isotópica de diferentes compostos em misturas, porém a validação do método continua sendo um desafio, devido à falta de Materiais de Referência Certificados (MRC) compatíveis com o sistema CG-C-EMRI (De BIÈVRE, 1993, BRAND *et al*, 2014). A maioria dos MRC isotópicos são produzidos e certificados através do sistema hifenado AE-EMRI e geralmente são compostos não voláteis, incompatíveis com o sistema CG-C-EMRI.

A *International Atomic Energy Agency* (IAEA, Vienna, Áustria) possui uma variedade de padrões isotópicos de $\delta^{13}C$, no entanto, não há nenhum certificado que atenda ao sistema CG-C-EMRI. Nesse caso é então necessário identificar e calibrar padrões secundários para cada análise (PANETTA; JAHREN, 2011) a partir dos padrões isotópicos internacionais através do sistema AE-EMRI.

No caso do etanol, o *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) produz o padrão de referência de etanol de vinho (BCR-656, $\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 26,91 ± 0,07 ‰) (IRMM, 2009), na faixa de valor isotópico de etanol oriundo de plantas C3. O valor isotópico do etanol de cana-de-açúcar é na faixa de valores isotópicos de plantas C4.

Uma das etapas essenciais nas medições dos valores isotópicos é a calibração do gás de referência (CO_2, por exemplo, para as medidas isotópicas de carbono), que é feita utilizando-se um material de referência. Sendo assim é evidente que o desenvolvimento e produção de MRC certificados para valores isotópicos de $\delta^{13}C$ são de extrema importância para garantir confiabilidade e rastreabilidade às suas

medições, assim como auxiliar no desenvolvimento de novos métodos e novas aplicações (BRAND *et al*, 2014).

Nesse contexto, se faz necessário o desenvolvimento de MRC de etanol combustível de cana-de-açúcar brasileiro certificado para os valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$). A Divisão de Metrologia Química, do Inmetro tem a função de desenvolver procedimentos de referência, produzir e certificar materiais de referência (FIORANTE *et al*, 2013). Dentre os MRC produzidos pelo Inmetro, podemos destacar o material de referência de Etanol Combustível (MRC 8648) certificado para os seguintes parâmetros: acidez total, pH, condutividade eletrolítica, massa específica, sulfato, teor de água, teor de etanol e sódio, porém não para os valores isotópicos.

O estudo da influência de diferentes métodos de calibração e normalização na exatidão das medidas isotópicas de carbono ($\delta^{13}C$) em amostras de etanol combustível por CG-C-EMRI desenvolvido nesse trabalho será utilizado nos estudos futuros de viabilidade para a certificação do material de referência de biocombustíveis para valores isotópicos. De acordo com o ABNT ISO GUIA 35, o estudo de viabilidade é uma das etapas para a certificação de um Material de Referência (MR) (INMETRO, 2014).

As etapas mais importantes nas medições dos valores isotópicos são a calibração do gás de referência e a normalização dos resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ (IAEA, 1995), onde são usados materiais de referência rastreáveis a escala internacional, como o *Vienna Peedee Belemnite* (VPDB) (COPLEN *et al*, 2006; COPLEN, 2011).

Para garantir a confiabilidade dos valores isotópicos encontrados foi avaliada a influência de diferentes fatores na exatidão dos resultados das medidas isotópicas de $\delta^{13}C_{VPDB}$ tais como, o tipo de coluna capilar, o padrão de calibração e o método de normalização.

Quando existem dúvidas sobre a faixa de linearidade da calibração ou sobre a estabilidade do sistema de medição ao longo do tempo, há alguns algoritmos empregados pelos laboratórios de metrologia para normalizar os dados brutos. Tais métodos de normalização necessitam de materiais de referência isotópicos certificados ou padrões secundários com valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ conhecidos e rastreáveis para garantir a precisão das medições isotópicas.

Diferentes métodos de normalização podem ser aplicados, dentre eles: (1) *single-point*, utilizando apenas um MR com valor isotópico conhecido; (2) *two-point*

ou *bracketing,* onde são usados dois materiais de referência com valores isotópicos conhecidos; (3) *multiple-point*, que é similar ao método de normalização *two-point*, porém nesse caso, a regressão linear é baseada em um número maior de materiais de referência (mais de dois) (PAUL; SKRZYPEK; FÓRIZS, 2007; LI, KE; ZHANG, LIN; ZHAO GUOXING, 2014; KIPPHARDT *et al*, 2000).

Além disso, para garantir a confiabilidade e rastreabilidade dos resultados de $\delta^{13}C$ obtidos, é necessário o conhecimento das propriedades dos analitos, como por exemplo, a determinação da pureza do material a ser analisado, com sua incerteza estabelecida, a partir de procedimentos que forneçam rastreabilidade a este valor.

Os padrões de substâncias orgânicas comercialmente disponíveis normalmente são acompanhados de um certificado com um valor declarado da pureza da substância principal. No entanto, esses resultados podem ser considerados apenas uma estimativa, que normalmente está baseada na razão de áreas obtidas por técnicas cromatográficas. O uso desses valores de pureza nos cálculos necessários para determinação de um valor de propriedade de um MR não fornecem rastreabilidade metrológica a este valor (DUEWER, 2004).

A pureza de um composto orgânico geralmente é expressa em termos de fração percentual de massa da substância sob investigação na amostra (% m/m) e pode ser obtida por medição direta do principal componente ou por determinação indireta ISHIKAWA, 2011; YIP; WONG; CHO, 2011; GOROG, 2005).

Os métodos indiretos quantificam as frações mássicas individuais de cada impureza da amostra, por exemplo, cromatografia à gás com detector de ionização de chama (CG-DIC) na qual é possível determinar as impurezas orgânicas (KING; WESTWOOD, 2001). A determinação da pureza por CG-DIC tem fundamento na determinação da fração de massa, tendo em conta os fatores como a capacidade de resposta dos analitos e as suas impurezas.

3.2 Experimental

3.2.1 Padrões e Materiais de Referência (MR)

O MR de uma mistura de n-alcanos (mistura denominada C3), contendo C17 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -31,16 ± 0,03 ‰), C19 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -33,17 ± 0,02 ‰), C21 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -29,10 ± 0,03 ‰), C23 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -31,77 ± 0,01 ‰) e C25

($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -28,48 ± 0,02 ‰), o de etanol C4 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 10,98 ± 0,02 ‰) e o de etanol C3 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 27,53 ± 0,02 ‰) da Universidade de Indiana (Bloomington, EUA) (SCHIMMELMANN, 2014) foi utilizado na calibração do gás de referência CO_2 e também como amostra controle. O MR de etanol de cana-de-açúcar certificado pelo Inmetro (MRC 8648) foi usado como padrão secundário. Os padrões foram diluídos em tolueno (grau HPLC, Tedia, Brasil).

Na calibração do sistema AE-EMRI foi utilizado o padrão de referência internacional NBS-22, $\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 30,031 ± 0,043 ‰ (IAEA, Viena, Áustria, 2009).

3.2.2 Amostras

Foram analisadas sete amostras de diferentes matérias-primas (cana-de-açúcar, trigo, beterraba e uva) e de diferentes regiões, sendo quatro do Brasil e três da França. As amostras de etanol combustível de cana-de-açúcar foram cedidas pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) e as amostras provenientes da Europa foram cedidas pelo *Union Nationale des Groupements de Distillateurs D'Alcool* da França.

As amostras foram acondicionadas em frasco âmbar e analisadas sem tratamento prévio. Suas características (matéria-prima e origem) estão descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Amostras de etanol combustível e suas respectivas matérias-primas e regiões.

Amostra	Matéria-Prima	Origem (Estado ou País)
SC 13	Cana-de-Açúcar	São Paulo - Brasil
SC 16	Cana-de-Açúcar	Mato Grosso do Sul - Brasil
SC 18	Cana-de-Açúcar	São Paulo - Brasil
SC19	Cana-de-Açúcar	Pernambuco - Brasil
Trigo	Trigo	Malakoff - França
Beterraba	Beterraba	Malakoff - França
Uva	Uva	Malakoff - França

3.2.3 Equipamentos

A determinação da razão isotópica das amostras de etanol combustível foi realizada em espectrômetro de massas de razão isotópica - Delta V Advantage – Interface com forno de combustão (para $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) e forno de Conversão Térmica (para $\delta^{18}O$ e de H/D) – acoplado ao cromatógrafo à gás Trace GC Ultra com amostrador automático AS 3000 (*Thermo Fisher Scientific*, Bremen, Alemanha).

Nas análises por AE-EMRI utilizou-se o analisador elementar Flash EA™1112 acoplado a espectrômetro de massas de razão isotópica DeltaPlus XL com interface ConFlo III (*Thermo Fisher Scientific*, Bremen, Alemanha), do Laboratório de Isótopos Estáveis do Cenpes/Petrobras.

Na determinação da pureza por CG-DIC utilizou-se cromatógrafo à gás com detector de ionização de chama (DIC) modelo GC-2010 (Shimadzu, Tóquio, Japão). As análises foram realizadas pelo Laboratório de Análise Orgânica (Labor) do Inmetro.

3.2.4 Calibração do gás de referência (CO_2)

O gás de referência CO_2 no sistema CG-C-EMRI foi calibrado usando um MR de uma mistura de n-alcanos (mistura C3) da Universidade de Indiana (Bloomington, EUA) (SCHIMMELMANN, 2014) com valores isotópicos conhecidos. Foram feitas 10 injeções do padrão e o pico correspondente ao C:17 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 31,16 ± 0,03 ‰) foi considerado como referência para todas as análises. O mesmo procedimento foi realizado para a calibração feita com o padrão de etanol C4 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -10,98 ± 0,02 ‰).

3.3 Métodos

3.3.1 Determinação da pureza por CG-DIC

A pureza orgânica das amostras de etanol combustível foi determinada por CG-DIC usando duas colunas capilares de diferentes polaridades: FFAP - polietilenoglicol (50 m x 0,53 mm x 1 µm) e HP-5 – 5 % fenil metil siloxano, 50 % dimetilolisiloxano (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm), ambas da marca *Agilent Techologies* (Califórnia, EUA), de acordo com documento do *National Institute of Standards and*

Technology (NIST) (DUEWER, 2004) e nas seguintes condições cromatográficas: volume de injeção de 1,0 µL no modo *splitless (*sem divisão de fluxo); temperatura do injetor de 200 °C e detector de 220 °C. O método de análise foi programado com fluxo da coluna capilar utilizando hélio como gás de arraste em uma vazão de 2 mL/min e programação do forno: 85 °C (30 °C/min) até 130 °C por 8 min.

Os resultados do teor de etanol das amostras do estudo foram expressos em g/100g e suas respectivas incertezas. A incerteza expandida para o valor de pureza, com fator de abrangência *k* = 2 (aproximadamente 95 % de confiança) foi calculada pela combinação da incerteza de caracterização cromatográfica, conforme ABNT ISO Guia 35 e JCGW (ISO GUIDE, 2006; JCGM, 2008).

3.3.2 Metodologia analítica para calibração do gás de referência (CO_2)

As amostras de etanol combustível foram analisadas com a mesma calibração do CO_2, realizada com o alcano C17, utilizando duas colunas capilares de diferentes polaridades: DB-5 – 5 % fenil metil siloxano, 50 % dimetilolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), marca *J&W Scientific* (Califórnia, EUA), com baixa polaridade e CP-WAX – polietilenoglicol (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), marca Varian Inc (Walnut, CA, EUA), com alta polaridade (Caso 1).

No Caso 2, as amostras de etanol combustível foram analisadas utilizando a mesma coluna capilar (CP-WAX), porém com calibrações distintas (*n*-alcano C17 e etanol C4). Em todos os casos, os métodos de análise foram programados com fluxo da coluna capilar ajustado para 1 mL/min utilizando hélio como gás de arraste.

As condições cromatográficas para cada calibração estão apresentadas abaixo:

Caso 1:

- ✓ **Análise da mistura de n-alcanos utilizando a coluna capilar DB-5**

A mistura de *n*-alcanos (1 µL da solução na concentração de 15 ng/µL em tolueno) foi injetada no modo *splitless*, temperatura do injetor de 250 °C; programação do forno: 150 °C por 5,0 min até 280 °C, sendo o tempo total de análise de 26 minutos.

- ✓ **Análise da mistura de n-alcanos utilizando a coluna capilar CP-WAX**

A mistura de *n*-alcanos (1 µL) foi injetada no modo *splitless*, temperatura do injetor de 250 °C; programação do forno: 150 °C até 235 °C (5 °C/min) sendo o tempo total de análise de 17 minutos.

Caso 2:

- ✓ **Análise do etanol C4 utilizando a coluna capilar CP-WAX**

O material certificado de etanol C4 (1µL) foi injetado no modo com divisão de fluxo – *split mode* – (1:300), temperatura do injetor de 200 °C; programação do forno: 50 °C até 120 °C (10 °C/min), sendo o tempo total de análise de 7 minutos.

3.3.2.1 Parâmetros do Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica (EMRI)

Alto vácuo: 10^{-6} mBar; massa/carga para os íons dos isótopos de carbono monitorados: *m/z* 44, *m/z* 45, *m/z* 46 e voltagem de ionização 124eV. A temperatura do forno de combustão em 1030 °C.

Para o padrão de mistura de *n*-alcanos: No início de cada corrida, o sistema foi submetido a três pulsos do gás de referência CO_2 por aproximadamente 30 s. Tempo de *backflush*: 400 s e o tempo total de análise: 1600 s.

Para o padrão de etanol combustível: três pulsos do gás de referência CO_2 foram submetidos no sistema por aproximadamente 20 s. Tempo de *backflush*: 180 s e tempo total de análise: 450 s. A temperatura do forno de oxidação foi de 1030 °C em ambos os métodos.

3.3.3 Calibração do sistema AE-EMRI

Para calibração do gás de referência CO_2 utilizou-se o padrão de referência internacional NBS-22, $\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 30,031 ± 0,043 ‰ (IAEA, Viena, Áustria), nas seguintes condições: temperaturas de 900 °C e 680 °C do reator de oxidação e redução, respectivamente. A temperatura do forno foi mantida a 45 °C.

3.3.4 Análise do etanol combustível por CG-C-EMRI

Para ambas as colunas capilares utilizadas (DB-5 e CP-WAX), as condições cromatográficas foram as seguintes: volume de injeção de 1,0 µL no modo com divisão de fluxo (1:300); temperatura do injetor de 200 °C. O método de análise foi programado com fluxo da coluna ajustado para 1,0 mL/min utilizando hélio como gás de arraste; programação do forno: 90 °C até 120 °C (rampa de 10 °C/min) sendo o tempo total de análise de 3,5 minutos. As amostras não sofreram tratamento prévio e foram injetadas seis replicatas.

3.3.5 Análise do etanol combustível por AE-EMRI

Foi pesado 1 mL de cada amostra de etanol combustível com cerca de 3,5 mg de polímero poroso Chromosorb® em cápsulas de estanho e colocados no amostrador automático.

3.3.6 Métodos de Normalização

Para todos os valores isotópicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos através do método analítico com a coluna capilar CP-WAX e os padrões de calibração etanol C3 e etanol C4 foram aplicados os seguintes métodos de normalização: curva de calibração, *single-point* e *bracketing*. O MR de etanol combustível produzido pelo Inmetro foi usado como padrão secundário.

3.3.6.1 Curva de Calibração

A curva de calibração foi construída com os resultados obtidos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ dos materiais de referência e os resultados brutos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ de cada amostra. Os coeficientes angular e linear foram então determinados através da regressão linear. Com os valores dos coeficientes, os valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ normalizados para cada amostra foi obtido através da equação da reta: $y = a + bx$, onde y é o valor $\delta^{13}C_{VPDB}$ normalizado, x é o valor bruto de $\delta^{13}C_{VPDB}$ medido da amostra; *a* e *b* são os coeficientes angular e linear, respectivamente (LI, KE; ZHANG, LIN; ZHAO GUOXING, 2014).

Em cada dia de análise, três materiais de referência foram injetados na mesma sequência das amostras: etanol de planta C4, etanol de planta C3 e o MRC de etanol combustível do Inmetro. O valor de $\delta^{13}C_{VPDB}$ para o MRC de etanol combustível do Inmetro foi determinado por AE-EMRI (rastreável ao VPDB através do padrão de referência internacional NBS-22).

3.3.6.2 *Single Point*

O método *single point* é usado para normalizar os valores isotópicos brutos de $\delta^{13}C$ utilizando apenas um MR. Nesse caso, o valor isotópico normalizado da amostra ($x_{amostra}$) é dado pela equação 3.1, onde $y_{amostra}$ e y_{MRC} são os valores brutos isotópicos obtidos da amostra e do MR, respectivamente (KIPPHARDT *et al*, 2000).

$$x_{amostra} = X_{MRC} \frac{y_{amostra}}{y_{MRC}}$$

Equação 3.1

O etanol de planta C4 foi utilizado como MR ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -10,98 ± 0,02 ‰) para as amostras de etanol de cana-de-açúcar. Para normalização dos valores de $\delta^{13}C$ das amostras de etanol de plantas C3 (uva, beterraba e trigo), o material de referência de etanol de planta C3 foi utilizado ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -27,53 ± 0,02 ‰) como referência. Ambos os materiais de referência foram injetados na mesma sequência (corrida) das amostras.

3.3.6.3 *Bracketing (two points)*

O método de normalização *bracketing* ou *two points* requer dois materiais de referência com valores isotópicos na faixa acima e abaixo do valor isotópico estimado para a amostra. Os resultados obtidos dos materiais de referência são usados na interpolação linear, conforme a equação 3.2:

$$x_{amostra} = \frac{x_2 - x_1}{y_2 - y_1}(y_{amostra} - y_1) + x_1$$

Equação 3.2

Onde y é o valor bruto de $\delta^{13}C$, x_1 e x_2 são os valores obtidos na medição dos materiais de referência e y_1 e y_2 é o valor isotópico bruto da amostra e $x_{amostra}$ é o valor isotópico normalizado para a amostra (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al*, 2007).

Foram utilizados os materiais de referência de etanol de planta C4 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -10,98 ± 0,02 ‰) e o etanol de planta C3 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 27,53 ± 0,02 ‰).

3.4 Análise Estatística

Os valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos por CG-C-EMRI de todas as replicatas foram submetidos ao teste de *Shapiro-Wilk* para verificar o tipo de distribuição. Os resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos nas diferentes colunas capilares e diferentes calibrações foram comparados usando o teste F para comparação das variâncias e o teste *t* para comparação das médias.

Os dados normalizados utilizando cada método de normalização (curva de calibração, *single point* e *bracketing*) foram comparados através do teste F e teste *t* com os valores de referência obtidos por AE-EMRI. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando *o software* STATISTICA®7.0.

3.5 Resultados e Discussão

3.5.1 Otimização das condições cromatográficas para a calibração do gás de referência (CO_2)

A boa resolução do método cromatográfico é um fator de extrema importância nas análises por CG-C-EMRI, pois a presença de picos co-eluídos afeta a exatidão e a precisão das medições dos valores isotópicos (VETTER; GAUL; MELCHER, 2007). Dentre os fatores de influência, foi avaliada a resolução cromatográfica dos diferentes métodos.

Foram testadas duas colunas capilares de diferentes polaridades para o etanol. A coluna capilar CP-WAX apresenta boa seletividade para compostos polares, mas apresenta maior perda da fase estacionária (sangramento), o que pode interferir na medição dos valores isotópicos. A coluna capilar DB-5 apresenta baixa seletividade para compostos polares, como o etanol, porém foi usada por ser uma coluna padrão

usada na instalação do sistema CG-C-EMRI por suportar temperaturas elevadas sem comprometer a sua fase estacionária.

O etanol é uma molécula volátil e mais suscetível ao fracionamento isotópico do que os alcanos usados na calibração do CO_2. Tais alcanos eluem da coluna capilar em diferentes tempos de retenção, o que torna do ponto de vista analítico, a calibração e a determinação de $\delta^{13}C$ das amostras processos distintos.

A Figura 3.1 mostra a sistemática usada para demonstrar os métodos analíticos na determinação do $\delta^{13}C$ das amostras de etanol combustível exemplificando as diferentes situações, utilizando diferentes colunas capilares e diferentes padrões para calibração.

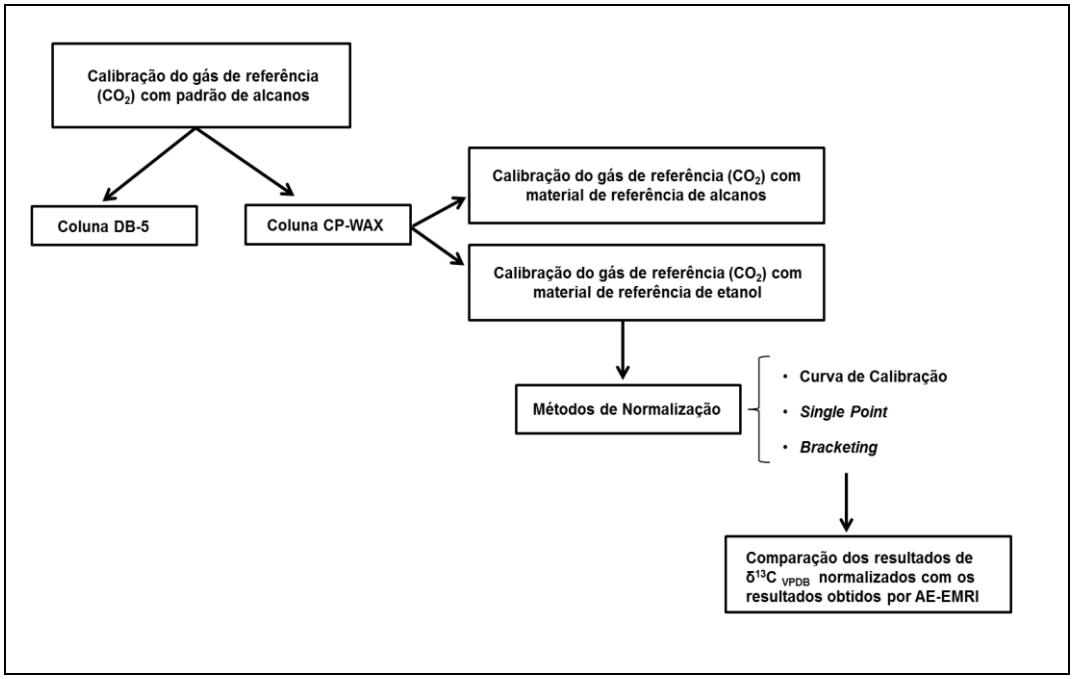

Figura 3.1 Esquema da avaliação da influência da coluna cromatográfica, do padrão de calibração e dos métodos de normalização nas medidas isotópicas de $\delta^{13}C_{VPDB}$ para o etanol combustível.

Para a análise estatística entre todas as medidas isotópicas de $\delta^{13}C_{VPDB}$, os experimentos foram divididos em dois casos: no caso 1, diferentes colunas capilares (DB-5 e CP-WAX) e o mesmo padrão de calibração (mistura de *n*-alcanos) foram empregados para avaliar a influência da coluna cromatográfica na determinação $\delta^{13}C$, mantendo-se constante a calibração realizada com o padrão de *n*-alcanos.

No caso 2, as amostras foram analisadas com a mesma coluna capilar (CP-WAX), porém usando diferentes valores de calibração de CO_2, sendo uma

calibração realizada com padrão de mistura de n-alcanos e a outra realizada com padrão de etanol para verificar a influência dos mesmos nas medições isotópicas.

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Os resultados do teste para o caso 1: diferentes colunas capilares (DB-5 e CP-WAX) e a mistura de *n*-alcanos como padrão de calibração são apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3; respectivamente.

Tabela 3.2 Resultados do teste de *Shapiro-Wilk* para o caso 1: coluna capilar DB-5 e a mistura de n-alcanos como o padrão de calibração.

Amostras	SC 13	SC16	SC 18	SC 19	Beterraba	Trigo	Uva
Média	-8,94	-11,02	-11,01	-10,64	-25,36	-25,50	-24,62
Desvio Padrão	0,03	0,01	0,03	0,03	0,04	0,06	0,06
DPR (%)	0,39	0,13	0,28	0,30	0,15	0,22	0,23
Shapiro–Wilk	0,97	0,89	0,97	0,90	0,93	0,89	0,90
p-value	0,89	0,40	0,89	0,43	0,64	0,37	0,42

Tabela 3.3 Resultados do teste de *Shapiro-Wilk* para o caso 1: coluna capilar CP-WAX e a mistura de n-alcanos como o padrão de calibração.

	SC 13	SC 16	SC 18	SC 19	Beterraba	Trigo	Uva
Média	-8,79	-11,35	-11,42	-11,03	-24,86	-25,29	-24,37
Desvio Padrão	0,15	0,06	0,10	0,13	0,09	0,15	0,07
DPR (%)	1,75	0,51	0,90	1,18	0,35	0,60	0,30
Shapiro–Wilk	0,86	0,99	0,98	0,92	0,89	0,84	0,98
p-value	0,24	0,99	0,95	0,53	0,37	0,18	0,96

Nas Tabelas 3.4 e 3.5 são apresentados os resultados do teste de *Shapiro-Wilk* para o caso 2: mesma coluna capilar (CP-WAX) e diferentes padrões de calibração (mistura de n-alcanos e padrão de etanol).

Tabela 3.4 Resultados do teste de *Shapiro-Wilk* para o caso 2: coluna capilar CP-WAX e a mistura de n-alcanos como o padrão de calibração.

	SC 13	SC 16	SC 18	SC 19	Beterraba	Trigo	Uva
Média	-12,15	-14,03	-13,91	-13,71	-27,95	-28,70	-27,40
Desvio Padrão	0,22	0,06	0,07	0,13	0,30	0,18	0,15
DPR (%)	1,83	0,43	0,50	0,95	1,08	0,65	0,56
Shapiro–Wilk	0,86	0,90	0,93	0,92	0,84	0,94	0,94
p-value	0,24	0,41	0,60	0,52	0,18	0,70	0,67

Tabela 3.5 Resultados do teste de *Shapiro-Wilk* para o caso 2: coluna capilar CP-WAX e padrão de etanol como o padrão de calibração.

	SC 13	SC 16	SC 18	SC 19	Beterraba	Trigo	Uva
Média	-9,59	-12,13	-12,14	-11,93	-25,80	-26,28	-24,68
Desvio Padrão	0,15	0,10	0,41	0,22	0,21	0,18	0,47
DPR (%)	1,52	0,78	3,35	1,84	0,81	0,69	1,90
Shapiro–Wilk	0,89	0,84	0,98	0,94	0,96	0,78	0,83
***p*-value**	0,38	0,18	0,95	0,68	0,81	0,05	0,13

De acordo com o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* e com os valores de p-value ($p > 0,05$), os resultados de $\delta^{13}C$ apresentam uma distribuição normal para ambos os casos 1 e 2. Para as análises de variância e comparação dos métodos (caso 1 e caso 2) foram aplicados os testes F e *t de Student,* respectivamente. No teste F foram avaliadas as variâncias, onde se $F_{calculado} > F_{crítico}$ as variâncias são consideradas diferentes e se $F_{calculado} < F_{crítico}$ as variâncias são consideradas equivalentes. Nas Tabelas 3.6 estão apresentados os resultados do teste F para ambos os casos e na Tabela 3.7 são apresentados os resultados do teste t.

Tabela 3.6 Resultados do teste F para análise de variância para cada amostra, nos casos 1 e 2.

Amostra	Caso 1		Caso 2	
	$F_{calculado}$	$F_{critico}$	$F_{calculado}$	$F_{critico}$
SC 13	19,6880	6,3882	6,8341	6,3882
SC 16	17,1965	6,3882	6,8825	6,3882
SC 18	10,8997	6,3882	1,3504	6,3882
SC 19	16,3371	6,3882	3,1041	6,3882
Beterraba	4,9810	6,3882	1,1111	6,3882
Trigo	7,4844	6,3882	1,2913	6,3882
Uva	1,7575	6,3882	5,1367	6,3882

Tabela 3.7 Resultados do teste *t* de *Student* para comparação das médias dos valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ para cada amostra, no caso 1 e no caso 2.

Amostra	Caso 1		Caso 2	
	$t_{calculado}$	$t_{crítico}$	$t_{calculado}$	$T_{crítico}$
SC 13	-2,121	2,306	-23,615	2,570
SC 16	12,216	2,306	-42,061	2,365
SC 18	8,483	2,306	-10,524	2,306
SC 19	6,541	2,306	-15,561	2,447
Beterraba	-19,501	2,447	-6,362	2,365
Trigo	-2,998	2,306	-7,381	2,306
Uva	-6,123	2,365	-17,496	2,447

No caso 1, os resultados do teste *t* demonstraram que existe diferença significativa entre a média dos resultados de $\delta^{13}C$ obtidos nas duas colunas capilares para todas as amostras, exceto para a amostra SC13 em que $|t_{calculado}| < |t_{crítico}|$ (Tabela 3.7). Para as demais amostras, existe diferença significativa nos resultados de $\delta^{13}C$ usando colunas capilares de diferentes polaridades e mesma calibração de CO_2.

A seletividade da coluna capilar está diretamente relacionada à resolução dos picos a qual influencia nos valores verdadeiros de $\delta^{13}C$, já que a co-eluição de contaminantes mesmo em baixos níveis de concentração poderá afetar os valores isotópicos. As diferentes interações com a fase estacionária da coluna pode causar fracionamento isotópico e em virtude disso, a boa resolução dos picos cromatográficos é um fator importante nas análises por CG-C-EMRI.

A identificação de fontes das possíveis variações no valor isotópico deve ser investigada a ponto de garantir que tais variações são provenientes do processo de medição e não da própria amostra a fim de se obter resultados precisos, rastreáveis e confiáveis.

Espera-se que os resultados obtidos com a coluna capilar CP-WAX sejam mais precisos quando comparados com os resultados obtidos com a coluna capilar DB-5, pois sua fase estacionária é adequada para os compostos polares o que de fato é demonstrado pela análise estatística em que os resultados obtidos pelos dois métodos não são estatisticamente equivalentes.

Da mesma forma, os resultados do teste *t* para o caso 2 indicam que há diferença entre as médias dos resultados de $\delta^{13}C$ obtidos com ambos os métodos de calibração do CO_2 ($|t_{calculado}| > |t_{crítico}|$ para todas as amostras, conforme apresentado na Tabela 3.7. Logo, pode-se afirmar que os resultados obtidos usando padrões de referência distintos para calibração do CO_2 também não são estatisticamente equivalentes e que têm influência na exatidão dos resultados dos valores isotópicos. Isso já era esperado pelo fato dos métodos de análise para cada padrão apresentar diferentes condições cromatográficas, como na divisão do fluxo e nas temperaturas de injeção.

Portanto, isso demonstra que para ter o método analítico ideal para uma medição é necessário empregar analitos e materiais isotópicos de referência semelhantes para referenciar à respectiva escala internacional.

O método utilizando a coluna capilar CP-WAX e a calibração do CO_2 com o padrão de etanol foi usado para determinar o valor $\delta^{13}C_{VPDB}$ de todas as amostras. O que demonstra que a utilização de coluna cromatográfica e material de referência para calibração adequados é de extrema importância nas medições isotópicas.

O material de referência usado na calibração do CO_2 deve atender a alguns critérios a fim de obter uma medição exata e precisa, tais como: pureza elevada, faixa dos valores isotópicos certificados no intervalo correspondente aos analitos de interesse e semelhança química com o material a ser analisado.

A Figura 3.2 mostra o cromatograma de uma amostra de etanol combustível obtido por CG-C-EMRI usando a coluna capilar CP-WAX.

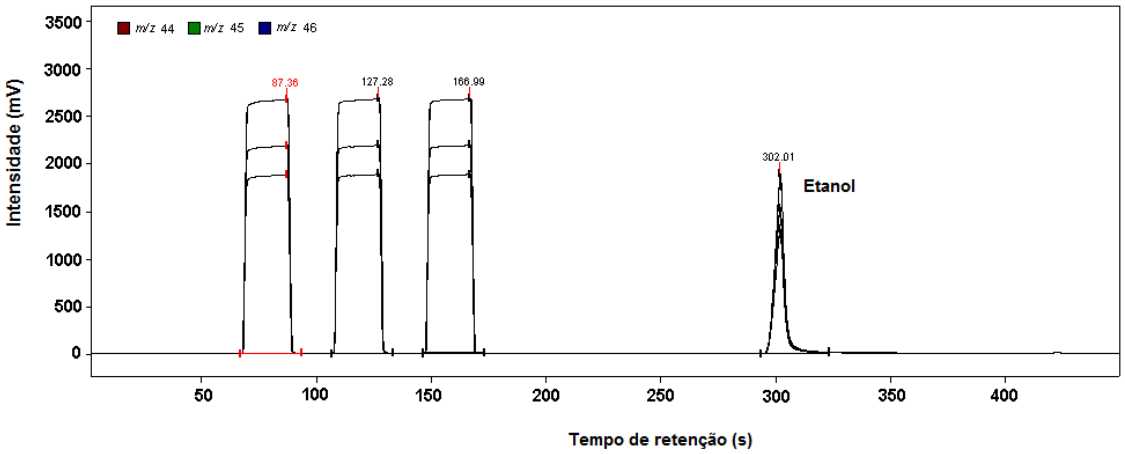

Figura 3.2 Cromatograma de uma amostra de etanol combustível obtido por CG-C-EMRI, utilizando a coluna capilar CP-WAX.

3.5.2 Comparação dos resultados AE-EMRI e CG-C-EMRI para determinação de $\delta^{13}C_{VPDB}$ nas amostras de etanol combustível

O AE-EMRI é uma técnica que fornece o valor do carbono orgânico total da amostra, ou seja, não há determinação da assinatura isotópica de compostos específicos, a menos que tenhamos uma amostra pura.

A pureza de cada amostra de etanol combustível foi determinada por CG-DIC. A Tabela 3.8 apresenta os resultados dos valores de pureza de cada amostra expresso em g/100g e suas respectivas incertezas.

Tabela 3.8 Resultados da pureza de cada amostra de etanol combustível analisadas por CG-DIC e suas respectivas incertezas.

Amostras	Fração mássica de etanol ± Incerteza Expandida (g/100g)
SC 13	99,9538 ± 0,0032
SC 16	99,9625 ± 0,0013
SC 18	99,9885 ± 0,0006
SC 19	99,9433 ± 0,0014
Trigo	99,9220 ± 0,0029
Beterraba	99,9992 ± 0,0012
Uva	99,6595 ± 0,0111
MRC 8648 (Inmetro)	99,9181± 0,0044

Todas as amostras apresentaram valores de pureza acima de 99,9 %, exceto para a amostra de uva, que apresentou o valor de (99,6595 ± 0,0111) g/100g. No entanto, esse nível de impurezas não é suficiente para afetar os valores isotópicos. O Material de Referência Certificado (MRC 8648) de Etanol Combustível produzido pelo Inmetro teve o valor certificado para pureza de (99,9181 ± 0,0044) g/100g (INMETRO, 2012).

Para verificar a exatidão do sistema AE-EMRI foram utilizados materiais de referência de etanol (C3 e C4) na calibração do CO_2 e nos métodos de normalização, tanto no CG-C-EMRI quanto no AE-EMRI. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.9 assim como o valor de $\delta^{13}C_{VPDB}$ = 12,16 ± 0,07 ‰ determinado para o MRC de etanol combustível do Inmetro, usado como padrão secundário.

Tabela 3.9 Valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) para os materiais de referência por AE-EMRI.

Material	AE-EMRI (Média ± DP)[a]	Valor Certificado
MR Indiana – Etanol C4	-10,85 ± 0,09	-10,98 ± 0,02
MR Indiana – Etanol C3	-27,30 ± 0,10	-27,53 ± 0,02
MRC Inmetro[b]	-12,16 ± 0,07	

[a] n = 3 replicatas;
[b] Usado como padrão secundário, não tem valor certificado para $\delta^{13}C_{VPDB}$.

Como no sistema AE-EMRI o valor isotópico da amostra é determinado na sua totalidade, a possibilidade de ocorrer fracionamento isotópico é maior do que no sistema CG-C-EMRI. Em virtude disso é considerado robusto e preciso, sendo

possível a comparação e validação dos resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos por CG-C-EMRI com os resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos por EA-EMRI, tidos como valores de referência.

Os resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos por CG-C-EMRI e AE-EMRI são apresentados na Tabela 3.10 e foram comparados estatisticamente.

Tabela 3.10 Valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ das amostras de etanol combustível obtidos por AE-EMRI.

Amostras	AE-EMRI (Média ± DP)[a]	CG-C-EMRI (Média ± DP)[b]
SC 13	-10,37 ± 0,04	-9,59 ± 0,14
SC 16	-12,76 ± 0,02	-12,13 ± 0,09
SC 18	-12,74 ± 0,03	-12,14 ± 0,40
SC 19	-12,45 ± 0,04	-11,93 ± 0,22
Beterraba	-27,29 ± 0,08	-25,80 ± 0,21
Trigo	-27,54 ± 0,08	-26,29 ± 0,18
Uva	-26,45 ± 0,03	-24,68 ± 0,47

[a]n = 3, [b]n = 6 replicatas.

Os resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos por CG-C-EMRI e AE-EMRI foram submetidos ao teste F e ao teste t. Na Tabela 3.11 são apresentados os resultados do teste F para análise das variâncias. Os resultados do teste t são apresentados na Tabela 3.12.

Tabela 3.11 Resultados do teste F para análise de variância.

Amostras	$F_{calculado}$	$F_{crítico}$
SC 13	11,2146	19,2964
SC 16	40,1521	19,2964
SC 18	194,6053	19,2964
SC 19	27,6501	19,2468
Beterraba	6,7957	19,2964
Trigo	5,0403	19,2964
Uva	224,3001	19,2964

Tabela 3.12 Resultados do teste t para comparação dos valores das médias dos $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos por AE-EMRI e CG-C-EMRI para as amostras de etanol combustível.

Amostras	$t_{calculado}$	$t_{crítico}$
SC 13	8,8278	2,3646
SC 16	15,8257	2,5706
SC 18	3,6113	2,5706
SC 19	5,1090	2,7764
Beterraba	11,6134	2,3646
Trigo	11,2322	2,3646
Uva	9,2196	2,5706

Os resultados do teste *t* para todas as amostras indicam que existe uma diferença significativa entre as médias dos resultados ($|t_{calculado}|>|t_{crítico}|$) usando ambas as técnicas de EMRI. Essa diferença pode ser atribuída à possibilidade de fracionamento isotópico no sistema CG-C-EMRI, pois podem ocorrer perdas no percurso do analito até o analisador de massas e também devido às possíveis interações do mesmo com a fase estacionária da coluna capilar, o que pode acarretar dispersões mais elevadas e variações aleatórias para as medições isotópicas de $\delta^{13}C$.

Os resultados brutos obtidos por CG-C-EMRI foram, portanto, submetidos aos métodos de normalização (curva de calibração, *single-point* e *bracketing*), empregando medições diárias dos materiais de referência isotópicos. Os respectivos valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos por AE-EMRI (*bracketing*), CG-C-EMRI (curva de calibração), CG-C-EMRI (*single point*) e CG-C-EMRI (*bracketing*) estão apresentados na Tabela 3.13.

Tabela 3.13 Resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) das amostras de etanol combustível obtidos por AE-EMRI (*bracketing*), CG-C-EMRI (curva de calibração), CG-C-EMRI (*single point*) e CG-C-EMRI (*bracketing*).

		CG-C-EMRI (Média ± DP)[b]		
Amostras	**AE-EMRI *Bracketing* (Média ± DP)[a]**	Curva de Calibração	*Single Point*	*Bracketing*
SC 13	-10,50 ± 0,04	-10,15 ± 0,15	-10,28 ± 0,15	-10,31 ± 0,14
SC 16	-12,90 ± 0,01	-12,42 ± 0,10	-12,32 ± 0,09	-12,39 ± 0,10
SC 18	-12,88 ± 0,03	-12,77 ± 0,42	-13,01 ± 0,43	-12,91 ± 0,41
SC 19	-12,59 ± 0,04	-12,55 ± 0,26	-12,79 ± 0,23	-12,69 ± 0,22
Beterraba	-27,48 ± 0,08	-27,61 ± 0,28	-27,62 ± 0,25	-27,63 ± 0,27
Trigo	-27,73 ± 0,08	-27,91 ± 0,18	-27,89 ± 0,16	-27,92 ± 0,18
Uva	-26,64 ± 0,03	-25,76 ± 0,50	-25,94 ± 0,45	-25,81 ± 0,49

[a]n = 3, [b]n = 6 replicatas.

Os resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos para cada método de normalização foram comparados aos resultados obtidos por AE-EMRI normalizados através do método *bracketing*.

Inicialmente, foi realizada uma análise de variância de um fator em blocos (amostras) para avaliar a existência de diferença estatística entre o valor de referência e os valores normalizados por cada método (curva de calibração*, single point* e *bracketing*) do valor isotópico de carbono $\delta^{13}C_{VPDB}$. O modelo linear para este tipo de delineamento é de acordo com a equação 3.3:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Equação 3.3

Onde, μ = média geral; Y_{ij}= valor medido no i-ésimo nível de medição e no *j*-ésimo bloco; τ_i = efeito do i-ésimo nível do tratamento; β_j = efeito do j-ésimo bloco; e ε_{ij} = erro de medição.

Assim como no modelo ANOVA de um fator, no caso do delineamento em blocos, foram feitas algumas suposições para a estimação dos parâmetros e condução dos testes de hipótese. Foram assumidas independência, homocedasticidade e normalidade dos erros de medição, bem como a independência entre níveis dos fatores e os blocos.

O objetivo da análise do modelo foi avaliar as possíveis diferenças entre os métodos de normalização aplicados aos resultados brutos. Na Tabela 3.14 tem-se o resultado do ANOVA para o modelo.

Tabela 3.14 ANOVA de um fator com blocos.

Fator de Variabilidade	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Estatística F	*p*-valor
Método	3	0,03	0,01	0,29	0,83
Bloco	6	1579,06	263,18	6657,05	< 0,01
Erro	18	0,71	0,04		
Total	27	1579,81			

Analisando os resultados do ANOVA, o *p*-valores associado aos testes F da análise de variância demonstra que não há diferença estatística entre os métodos analisados, enquanto que há diferença entre os blocos, o que era esperado.

Apesar de comum neste tipo de delineamento por blocos (KUTNER,1996), pouca informação pode levar a conclusões errôneas quanto à existência de diferença estatística entre os tratamentos. Além disso, um menor número de dados dificulta a avaliação quanto à adequabilidade das suposições paramétricas assumidas para a condução dos testes de hipóteses.

Por isso, o teste de Friedman foi aplicado (Tabela 3.15) com o mesmo objetivo do teste aplicado anteriormente, ou seja, avaliar a existência de diferença entre os métodos de medição no contexto do delineamento em blocos e de medidas repetidas. O teste de Friedman [(FRIEDMAN, 1937)] é uma alternativa não-paramétrica do teste anterior e avalia se três ou mais grupos dependentes foram extraídos de uma mesma população, sem supor a distribuição normal aos resíduos. Sua estatística de teste é dada pela razão entre somas de quadrados de ranks e, quando o número de blocos (n) for maior do que 15 e/ou o número de tratamentos (k) for maior do que quatro, possui distribuição aproximadamente igual à de Qui-quadrado com k-1 graus de liberdade.

Tabela 3.15 Resultados do Teste de Friedman.

Graus de Liberdade	Estatística do Teste	Valor Crítico	*p*-valor
3	2,49	7,80	0,48

Conforme observado na Tabela 3.15, o resultado da estatística do teste de Friedman 2,49 em face ao valor crítico (7,80) ou ainda a análise do *p*-valor associado (0,48) leva a não rejeição da hipótese de homogeneidade entre os métodos AE-EMRI (*bracketing*), CG-C-EMRI (curva de calibração), CG-C-EMRI (*single point*) e CG-C-EMRI (*bracketing*). Com isso, pode-se concluir que os resultados dos valores isotópicos são estatisticamente equivalentes.

Esses resultados indicam que, independentemente do método de normalização, os valores isotópicos após a normalização tornaram-se mais exatos do que os resultados brutos obtidos por CG-C-EMRI. No entanto, para os três métodos de normalização aplicados, o procedimento ideal seria a utilização de materiais de referência com valores de $\delta^{13}C$ na faixa dos isótopos de interesse. Contudo há dificuldade de se obter materiais de referência compatíveis com as análises de CG-C-EMRI, tornando o procedimento dificultoso.

A Figura 3.3 mostra a correlação dos valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ das amostras de etanol combustível obtidos por AE-EMRI e dos valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ das amostras de etanol combustível obtidos por CG-C-EMRI usando o *bracketing* como o método de normalização.

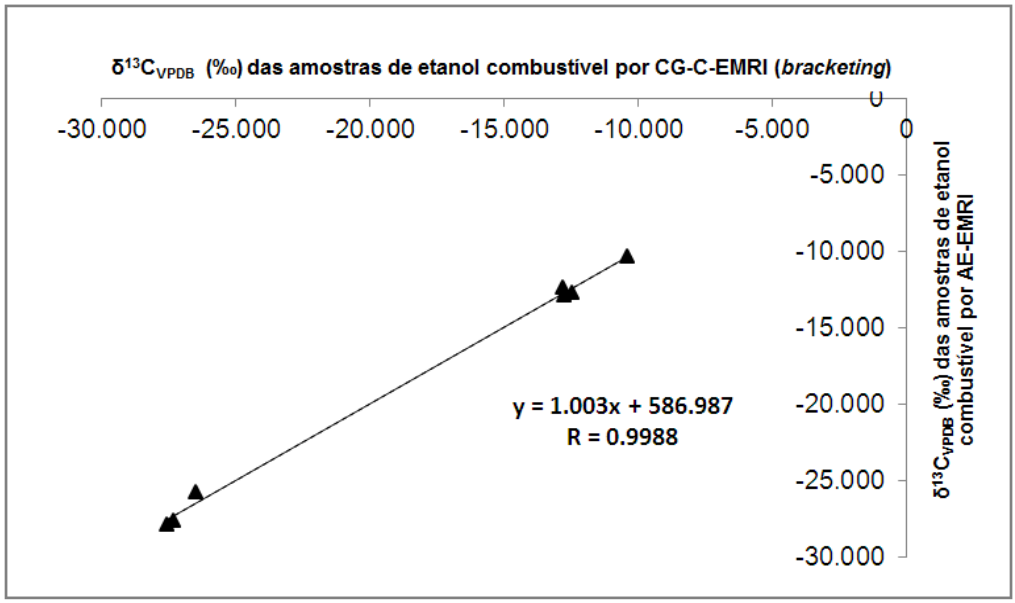

Figura 3.3 Correlação dos resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) das amostras de etanol combustível por AE-EMRI versus os resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ das amostras de etanol combustível por CG-C-EMRI (método *bracketing* de normalização).

Na equação da reta obtida para a curva apresentada y = 1,003 x + 586,987 e r^2 = 0,9988 (Equação 3.3), verifica-se uma ótima correlação, mas na verdade, mais valores de $\delta^{13}C$ distribuídos em toda a gama de valores isotópicos forneceria uma correlação mais forte entre as duas técnicas, o que é realmente difícil, com base na diferença existente entre a razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ para os combustíveis de etanol do C3 e etanol C4 (Figura 3.3) (SPITZKE; FAUHL-HASSEK, 2010).

3.6 Conclusões

O estudo da influência de diferentes métodos de calibração e normalização na exatidão das medições do valor isotópico ($\delta^{13}C$) em amostras de etanol combustível por CG-C-EMRI demonstrou o impacto do uso do material de referência isotópico adequado na calibração dos sistemas de EMRI e da coluna capilar adequada de acordo com o analito de interesse, na exatidão e confiabilidade nos resultados das medidas isotópicas.

Os métodos de normalização devem ser aplicados aos valores brutos de $\delta^{13}C$, empregando pelo menos um material de referência isotópico. Todos os três métodos de normalização aplicados foram equivalentes em desempenho, levando a cerca de 50 % de aproveitamento dos resultados obtidos por CG-C-EMRI quando comparados aos resultados obtidos por AE-EMRI, tendo a mesma como referência devido à rastreabilidade ao VPDB através do material de referência NBS-22.

Todos os diferentes métodos de calibração do gás de referência, as condições e procedimentos de normalização apresentados enfatizam a importância da utilização de protocolos de qualidade e também alertam para a importância do uso de um MRC rastreável a escala VPBD, compatível e certificado para as análises por CG-C-EMRI.

Com a aplicação desta metodologia para a análise de etanol, é possível a criação de uma base de dados da assinatura isotópica do etanol combustível no Brasil, por exemplo. Com a análise estatística pode-se estimar os valores isotópicos esperados para amostras de etanol e assim torna-se possível a identificação da fonte de matéria-prima de amostra desconhecida de etanol combustível.

Com relação ao MR, como cada laboratório emprega diferentes materiais, destaca-se a importância da certificação de materiais com valores isotópicos por institutos de metrologia e acreditação de produtores de MR de forma a garantir a rastreabilidade ao VPDB nas medições de $\delta^{13}C$.

CAPÍTULO 4

Determinação do perfil da distribuição isotópica de carbono ($\delta^{13}C$) do bioetanol de cana-de-açúcar no Brasil

4. Introdução

4.1 Bioetanol

A busca por novas fontes de energia que sejam economicamente viáveis, competitivas no desempenho com os derivados do petróleo bruto e capazes de gerar cada vez menos resíduos tóxicos, filosofia também conhecida como Química sustentável ou Química verde é crescente considerando-se a necessidade de contínuos desenvolvimentos econômico, ambiental e sustentável nos dias atuais (HO; NGO; GUO, 2014). Nesse contexto, o etanol combustível tem sido um dos combustíveis renováveis mais atraentes e consequentemente a sua produção e o seu uso têm aumentado em todo o mundo nos últimos anos (UNICA, 2014).

Em 1975, o Brasil lançou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), cujo objetivo maior era a redução da dependência nacional em relação ao petróleo importado. Hoje em dia, quase a metade da energia do Brasil vem de fontes renováveis, o que torna o etanol combustível uma parte fundamental da sua matriz energética, principalmente quando o mesmo é produzido a partir de cana-de-açúcar.

Segundo os dados da *International Energy Agency* (IEA, 2014), a utilização de etanol produzido a partir da cana-de-açúcar reduz em média 89 % à emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa – como dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4) – se comparado com a gasolina. O etanol produzido a partir de outras fontes também contribui para a diminuição da emissão desses gases, porém em menor escala. No caso do etanol produzido a partir da beterraba, por exemplo, a redução é de 46 % (UNICA, 2014).

Em todo o ciclo do combustível, o etanol lança menos CO_2 à atmosfera pelo fato dele ser extraído da cana-de-açúcar. Durante a fotossíntese, as plantas absorvem o gás carbônico da atmosfera, ocasionando que quase todo o gás seja absorvido pela própria cana-de-açúcar. No caso dos combustíveis fósseis, é lançado o CO_2 extraído da terra (petróleo), ocasionando um aumento do teor desse gás na atmosfera.

Além disso, a viabilidade do etanol produzido a partir da cana-de-açúcar também se consolida através da sua produtividade devido ao alto rendimento por hectare cultivado. O hectare de cana-de-açúcar produz 7.500 litros de etanol e em contrapartida, o hectare plantado de milho produz 3.000 litros (UNICA, 2014).

Conforme citado anteriormente, o etanol pode ser produzido a partir de diferentes fontes (KUMAR; SINGH; PRASAD, 2010). No Brasil, o etanol é produzido a partir da cana-de-açúcar, nos Estados Unidos, principalmente a partir de milho e no Canadá a partir de trigo e milho (FREITAS *et al*, 2010).

Com essa diversidade de matérias-primas, a certificação da origem é uma forma de atestar qualidade ao bioetanol, que pode ser feita pela determinação da razão isotópica de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$) através da técnica de espectrometria de massas de razão isotópica. Com a assinatura isotópica é possível identificar a biomassa do etanol verde ou bioetanol utilizadas na produção do biocombustível.

Os valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ do bioetanol são dependentes dos diferentes mecanismos de fixação do CO_2 durante o processo de fotossíntese. No tecido das plantas, a principal fonte de variação da relação $^{13}C/^{12}C$ está nos diferentes mecanismos de fixação do dióxido de carbono (CO_2) durante a fotossíntese (ISHIDA-FUJII, 2005). A fixação do carbono na fotossíntese ocorre por dois caminhos que diferem quanto ao número de carbonos no primeiro composto intermediário formado. Os dois caminhos são conhecidos como ciclo de Calvin-Benson (C3) e o de Hatch-Slack (C4). A base de variação isotópica em plantas resulta do fracionamento isotópico durante a fotossíntese. As plantas terrestres podem ser divididas em três grupos fotossintéticos, cada um com seu padrão de fracionamento isotópico específico: C3, C4 e CAM (metabolismo ácido das crassuláceas), sendo que os metabolismos C3 e C4 são muito mais abundantes (GIEBEL; SWART RIEMER, 2011).

A variação na composição isotópica destas plantas é resultado das (i) propriedades bioquímicas da fixação primária de CO_2 por ação enzimática; (ii) das limitações da difusão do CO_2 dentro das folhas (BOUTTON, 1991) e (iii) da relação entre a pressão interna de CO_2 na câmara dos estômatos e a pressão externa da atmosfera (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989).

As plantas com via fotossintética C3 (por exemplo, uva, arroz, cevada, etc) reduzem o CO_2 para fosfoglicerato (composto de três carbonos) através da enzima

ribulose-1,5-difosfato carboxilase. Esta enzima diferencia o $^{13}CO_2$, resultando em valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ relativamente baixos, entre - 32 e - 23 ‰.

As plantas com via fotossintética C4 (por exemplo, cana-de-açúcar e milho) reduzem o CO_2 a ácido aspártico ou málico, (com quatro átomos de carbono nas moléculas), através da enzima PEP-carboxilase (fosfoenolpirúvico carboxilase). Esta enzima não diferencia tanto o $^{13}CO_2$ como a RuBP-carboxilase, desta forma plantas C4 tem valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ relativamente mais altos. Tais valores variam entre -15 a -9 ‰. No caso da cana de açúcar, uma espécie vegetal do ciclo fotossintético C4, o valor isotópico de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$) é em torno de -14 ‰. Assim, as espécies C3 e C4 têm valores distintos, que não se sobrepõem, sendo possível, portanto, a utilização desses valores na determinação da fonte de carbono.

Nas plantas com metabolismo do ácido crassuláceo (MAC), ambas carboxilases estão presentes. Estas plantas são capazes de realizar fixação do CO_2 pelos dois tipos de ciclo (C3 e C4) e produzem uma gama de valores de $\delta^{13}C$ em torno de -17 ‰.

Essa diferença no enriquecimento relativo ($\delta^{13}C_{VPDB}$) entre as plantas C3 e C4 também é encontrada nos seus produtos derivados, como o açúcar e o álcool, podendo assim determinar com precisão qual a origem botânica do carbono em determinado produto (ROSSMANN, 2001). A determinação da composição isotópica é utilizada, por exemplo, na detecção de açúcares de origem C4 em sucos de frutas naturais (GUILLOU *et al*, 1999) e também na identificação de possíveis adulterações em amostras de mel com açúcares C4 comerciais (PADOVAN *et al*, 2003).

O Brasil é o maior produtor de etanol obtido a partir de cana-de-açúcar do mundo. A determinação da assinatura isotópica de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$) permite diferenciar o bioetanol brasileiro dos demais produzidos a partir de outras fontes de matéria-prima, garantindo a qualidade e rastreabilidade a esse biocombustível.

4.2 Objetivo

Determinação da assinatura isotópica do bioetanol de cana-de-açúcar avaliando-se amostras de etanol combustível de diferentes regiões do Brasil e com a análise estatística dos resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ traçar um perfil isotópico do bioetanol no Brasil.

4.3 Experimental

4.3.1 Amostras

Foram analisadas 31 amostras de etanol combustível de cana-de-açúcar produzidas em diferentes regiões do Brasil e seis amostras de diferentes matérias-primas (trigo, beterraba, uva e milho) advindas de outros países (Estados Unidos e França), conforme apresentado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Amostras de etanol combustível de cana-de-açúcar e suas respectivas origens e matérias-primas.

País	Estado/Cidade	Matéria-prima
Brasil (31 amostras)	São Paulo (SP) Rio de Janeiro (RJ) Pernambuco (PE) Mato Grosso (MT) Desconhecido (ND*)	Cana-de-açúcar
Outros países (6 amostras)	França e Estados Unidos	Beterraba, uva, trigo e milho

*ND: Não determinado (origem desconhecida)

As amostras foram estocadas a temperatura de 4 °C e analisadas sem tratamento prévio.

4.3.2 Padrões e Materiais de Referência

Os seguintes materiais de referência foram utilizados: o material de referência de etanol C4 da Universidade de Indiana (Bloomington, EUA, $\delta^{13}C_{VPDB}$ = -10,98 ± 0,02 ‰) e o material de referência de etanol C3 da Universidade de Indiana (Bloomington, EUA, $\delta^{13}C_{VPDB}$ = -27,53 ± 0,02 ‰).

4.3.3 Equipamentos

As análises das amostras de etanol combustível foram realizadas em espectrômetro de massas de razão isotópica - Delta V Advantage (modelo MAT 253) – Interface com forno de combustão (para $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) e forno de Conversão

Térmica (para $\delta^{18}O$ e de H/D) – acoplado ao cromatógrafo à gás Trace GC Ultra com amostrador automático AS 3000 (*Thermo Fisher Scientific*, Bremen, Alemanha).

4.3.4 Métodos

4.3.4.1 Calibração do gás de referência (CO_2)

O gás de referência CO_2 no sistema CG-C-EMRI foi calibrado usando o material de referência de etanol C4 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -10,98 ± 0,02 ‰).

O material certificado de etanol C4 (1µL) foi injetado 10 vezes no modo com divisão de fluxo – *split mode* – (1:300), temperatura do injetor de 200 °C; programação do forno: 50 °C até 120°C (10 °C/min).

4.3.4.2 Análise do etanol combustível por CG-C-EMRI

As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna capilar CP-WAX – polietilenoglicol (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), marca Varian Inc (Walnut, CA, EUA); volume de injeção de 1,0 µL no modo com divisão de fluxo (1:300); temperatura do injetor de 200 °C. O método de análise foi programado com fluxo da coluna capilar ajustado para 1,0 mL/min utilizando hélio como gás de arraste; programação do forno: 90 °C até 120 °C (rampa de 10 °C/min) totalizando 3,5 minutos de análise.

As amostras não sofreram tratamento prévio e foram injetadas seis replicatas.

4.3.4.3 Parâmetros do Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica (EMRI)

Alto vácuo: 10^{-6} mBar; massa/carga para os íons dos isótopos de carbono monitorados: *m/z* 44, *m/z* 45, *m/z* 46 e voltagem de ionização 124eV.

Para o material de referência de etanol e para as amostras de etanol combustível, três pulsos do gás de referência CO_2 foram submetidos no sistema por aproximadamente 20 s. Tempo de *backflush*: 180 s e o tempo total de análise: 450 s. Temperatura do forno de combustão: 1030 °C.

4.3.5 Método de Normalização

Todos os valores isotópicos brutos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos foram normalizados utilizando o método de normalização *bracketing*. Os seguintes materiais de referência foram utilizados: o material de referência de etanol C4 da Universidade de Indiana (Bloomington, EUA, $\delta^{13}C_{VPDB}$ = -10,98 ± 0,02 ‰) e o material de referência de etanol C3 da Universidade de Indiana (Bloomington, EUA, $\delta^{13}C_{VPDB}$ = -27,53 ± 0,02 ‰).

Os materiais de referência foram analisados na mesma sequência de análise das amostras. Os resultados obtidos de $\delta^{13}C$ dos materiais de referência foram usados no método de interpolação linear (PAUL; SKRZYPEK; FÓRIZS, 2007).

4.4 Análise Estatística

Inicialmente uma análise exploratória da variável de interesse foi conduzida com o objetivo de descrevê-la em relação aos demais fatores de influência, como: a matéria-prima (cana-de-açúcar, milho, trigo, beterraba e uva), o metabolismo da planta (C3 ou C4) e sua origem (estados do Brasil, França e Estados Unidos). Por meio de ferramentas quantitativas e gráficas foram avaliadas as correlações entre os fatores de influência e apontadas as características gerais e específicas da medição do valor isotópico de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$) do bioetanol no cenário internacional.

Em um segundo momento, a fim de se estabelecer um perfil do bioetanol no Brasil, foi conduzida uma análise inferencial sobre o valor isotópico de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$) objetivando obter, sobretudo, a estimativa de um valor pontual que melhor representasse em conjunto o valor isotópico. O teste de Levene (LEVENE, 1960) foi aplicado para verificar a homogeneidade das variâncias de cada amostra (com cinco replicatas) e o gráfico *QQ-plot* (McGILL; TUKEY; LARSEN, 1978), um teste visual, utilizado para investigar a normalidade dos dados.

Finalmente, para descrever o intervalo de variação dos valores isotópicos, a função de densidade de probabilidade (“fdp” ou “pdf”) foi estimada através do modelo de densidade de *kernel* (WILK; GNANADESIKAN, 1968). Os intervalos de confiança para cada estimador foram avaliados usando a técnica de *bootstrap (*JOANES; GILL, 1998). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o *software* R (R CORE TEAM, 2014) e nível de confiança de 95 %.

4.5 Resultados e Discussão

Os valores isotópicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ de 37 amostras de etanol combustível provenientes de produtores nacionais e internacionais foram analisados. Uma análise exploratória dos dados obtidos foi realizada para avaliar as possíveis correlações entre os fatores de influência e para apontar as características gerais e específicas no perfil isotópico do bioetanol no cenário brasileiro e internacional. Uma análise estatística inferencial dos dados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ das amostras de cana-de-açúcar foi realizada com o objetivo de se estimar um valor de $\delta^{13}C_{VPDB}$ e um intervalo que representasse o conjunto de dados.

4.5.1 Análise exploratória do valor isotópico ($\delta^{13}C_{VPDB}$)

As 37 amostras de etanol combustível analisadas de $\delta^{13}C_{VPDB}$ foram separadas em grupos de acordo com as variáveis: matérias-primas, metabolismo fotossintético e nacionalidade.

Na Tabela 4.2 encontra-se a distribuição de frequências da variável de interesse de acordo com a nacionalidade e a matéria-prima das amostras e na Tabela 4.3 são apresentados os resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$, segundo o metabolismo fotossintético e a matéria-prima de cada amostra.

Tabela 4.2 Distribuição de frequências das amostras de bioetanol de acordo com a matéria-prima e origem (diferentes regiões do Brasil e outros países).

Nacionalidade	Local (Estado/País)	Matéria-Prima	Frequência (por nacionalidade)	Percentual (%) (por nacionalidade)
Brasil (31 amostras)	São Paulo (SP)	Cana-de-açúcar	13	41,94
	Rio de Janeiro (RJ)		3	9,68
	Pernambuco (PE)		1	3,22
	Mato Grosso (MT)		1	3,22
	Desconhecido (NA)		13	41,94
	TOTAL		31	100 %
Outros países (6 amostras)	França	Uva, Trigo, Beterraba	4	66,67
	Estados Unidos	Milho	2	33,33
	TOTAL		6	100 %

Tabela 4.3 Medidas resumo do valor isotópico de carbono $\delta^{13}C_{VPDB}$ segundo o metabolismo e a matéria-prima.

Estatística	Metabolismo		Matéria-Prima		
	C3	C4	Cana-de-açúcar	Milho	Uva,Trigo e Beterraba
Tamanho Amostral	4	33	31	2	4
Média	-27,24	-12,23	-12,38	-9,78	-27,24
Mediana	-27,61	-12,40	-12,41	-9,78	-27,61
Mínimo	-27,92	-13,24	-13,24	-9,88	-27,92
Máximo	-25,83	-9,68	-10,30	-9,68	-25,83
Desvio-padrão	0,95	0,88	0,64	0,14	0,95
Coeficiente de Variação	-0,03	-0,07	-0,05	-0,01	-0,03

Pode-se observar que as amostras de bioetanol de cana-de-açúcar apresentam valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ em torno de -12,39 ‰. Somente a amostra de bioetanol de milho apresentou um valor de $\delta^{13}C_{VPDB}$ em torno de -9,78 ‰, conforme demonstrado no gráfico da Figura 4.1 que ilustra a distribuição dos dados de acordo com as variáveis nacionalidade e matéria-prima.

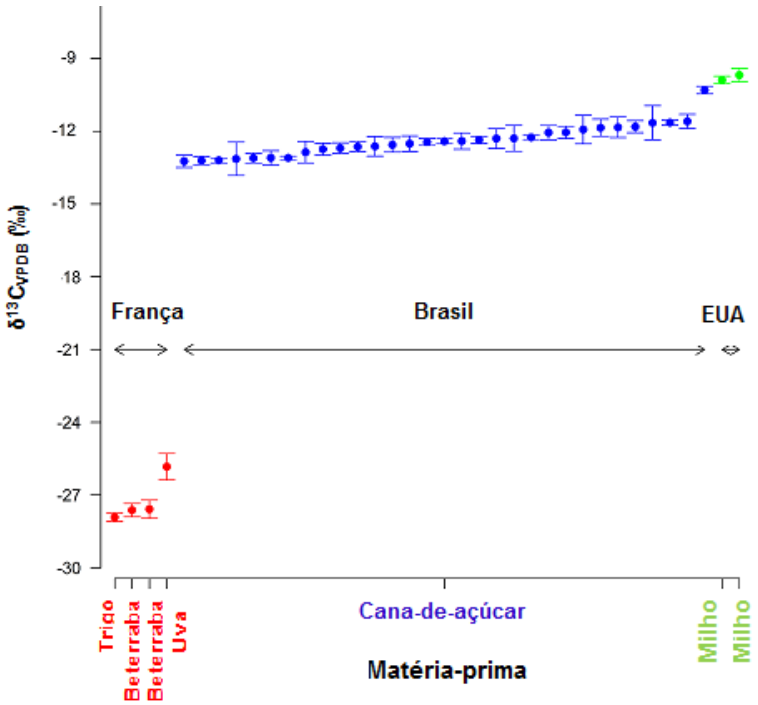

Figura 4.1 Distribuição dos dados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ do bioetanol de acordo com as variáveis: matéria-prima, metabolismo e origem geográfica.

Os valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ apresentados na Tabela 4.2 (p. 73) também foram plotados em um *Box plot* (McGILL; TUKEY; LARSEN, 1978) (gráfico de caixa), conforme apresentado na Figura 4.2, que é útil na avaliação da distribuição empírica de variáveis quantitativas. Nele é possível observar a variabilidade (largura da caixa), a simetria (distribuição em torno da mediana) e os possíveis *outliers* (pontos fora da caixa) do conjunto univariado.

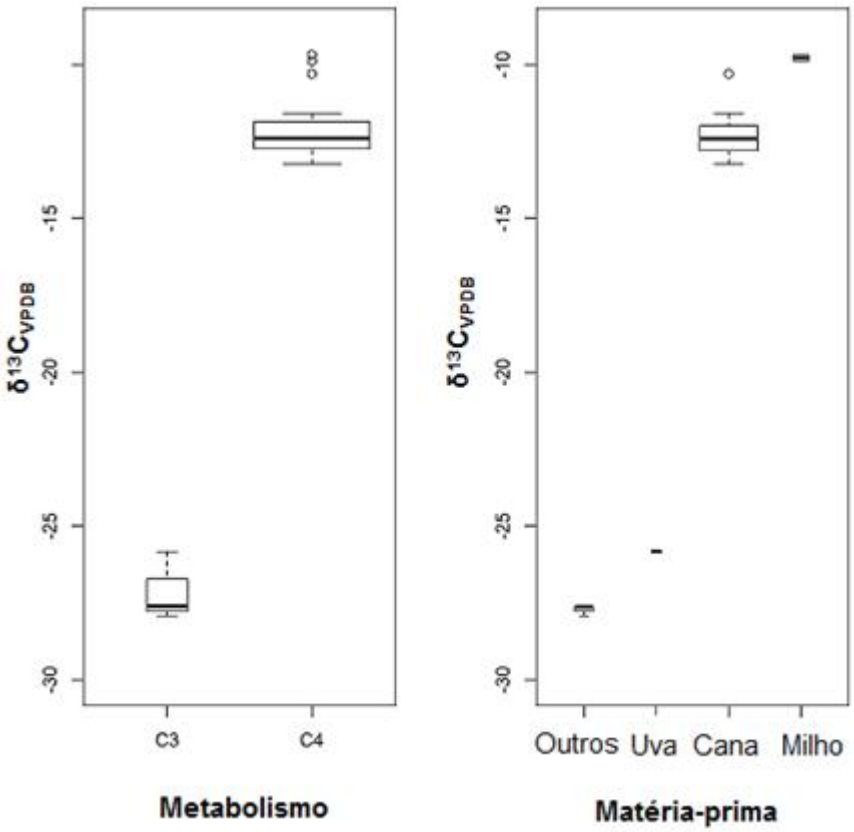

Figura 4.2 *Box plot* da distribuição dos dados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ de acordo com o metabolismo.

Na Tabela 4.3 (p.74) estão apresentados os coeficientes de variação (CV) para os três tipos de matérias-primas: - 0,05 para o bioetanol produzido a partir da cana-de-açúcar; -0,01 para o bioetanol produzido a partir de milho; e -0,03 para as demais amostras. Esses pequenos valores de desvios-padrão em relação à média sugerem uma boa congruência entre as amostras de diferentes tipos de matérias-primas e alta precisão e exatidão para as medições de $\delta^{13}C_{VPDB}$ de bioetanol.

4.5.2 Análise Estatística Inferencial: o perfil isotópico do bioetanol no Brasil

A análise estatística inferencial conduzida teve como finalidade tirar conclusões sobre uma variável de interesse a partir de uma amostra representativa da mesma e assim estimar um valor para $\delta^{13}C_{VPDB}$ que representasse a distribuição de probabilidade para as 31 amostras de bioetanol de cana-de-açúcar produzidas no Brasil. A distribuição dos resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ das amostras analisadas de bioetanol de cana-de-açúcar produzidas no Brasil está representada na Figura 4.3.

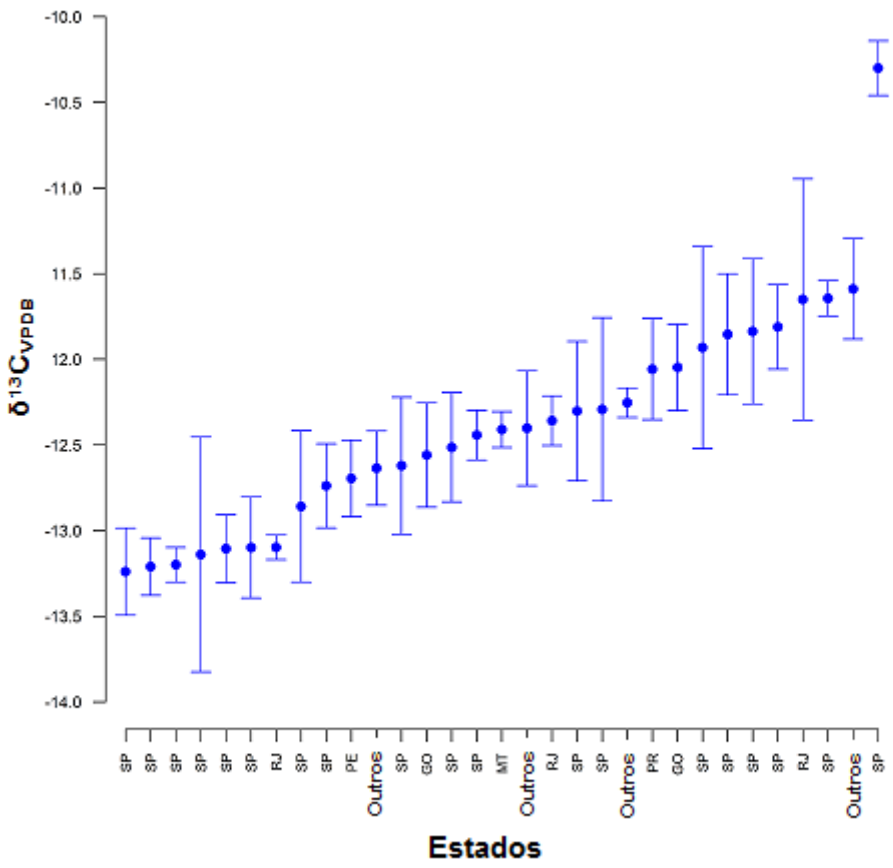

Figura 4.3 Distribuição dos resultados de $\delta^{13}C$ das amostras analisadas do bioetanol de cana-de-açúcar produzido no Brasil.

Para as demais matérias-primas (milho, trigo, beterraba e uva), a análise estatística inferencial não foi realizada devido ao pequeno número de amostras e os seus valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ estão descritos apenas como informação.

A Figura 4.3 sugere uma heterocedasticidade para os resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ das amostras de bioetanol de cana-de-açúcar. O teste clássico de Levene (DOANE; SEWARD, 2011) foi aplicado para avaliar se existe uma diferença significativa entre as replicatas das 31 amostras de bioetanol de cana-de-açúcar. Com o valor de F= 2,39 e respectivo *p-value* de 0,0035, com intervalo de confiança de 95 %, a hipótese nula de variâncias iguais foi rejeitada, confirmando a heterocedasticidade entre as amostras. Essa informação foi usada então para estimar a "pdf" do valor isotópico de carbono $\delta^{13}C_{VPDB}$.

Seguindo a análise, foi calculado o coeficiente de assimetria (A) de Pearson (PEARSON, 1929), A = 1,0 > 0, indicando uma assimetria positiva na distribuição dos dados. Já o coeficiente de curtose de Pearson calculado, k = 4,89, indicou que esta função de probabilidade é leptocúrtica, ou seja, é mais concentrada em relação à distribuição Gaussiana. Para melhor visualização dessas características, basta observar o histograma na Figura 4.4.

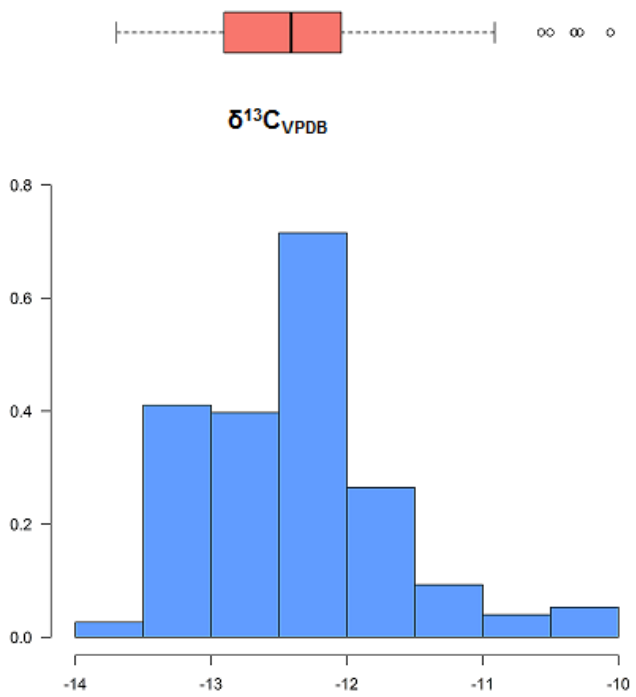

Figura 4.4 Histograma com os dados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ do bioetanol de cana-de-açúcar.

O histograma da Figura 4.4 indica uma ligeira assimetria positiva, que pode ter sido causada pelos valores altos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos para algumas amostras. Observa-se que há somente um pico de frequência no histograma, em torno de - 12,30 ‰, o que sugere uma distribuição unimodal.

O gráfico quantil-quantil - *QQ-plot* (WILK; GNANADESIKAN, 1968) foi utilizado para determinar se dois conjuntos de dados pertencem à mesma distribuição de probabilidades. Na Figura 4.5 temos o gráfico *QQ-plot* para a variável "valor isotópico de carbono".

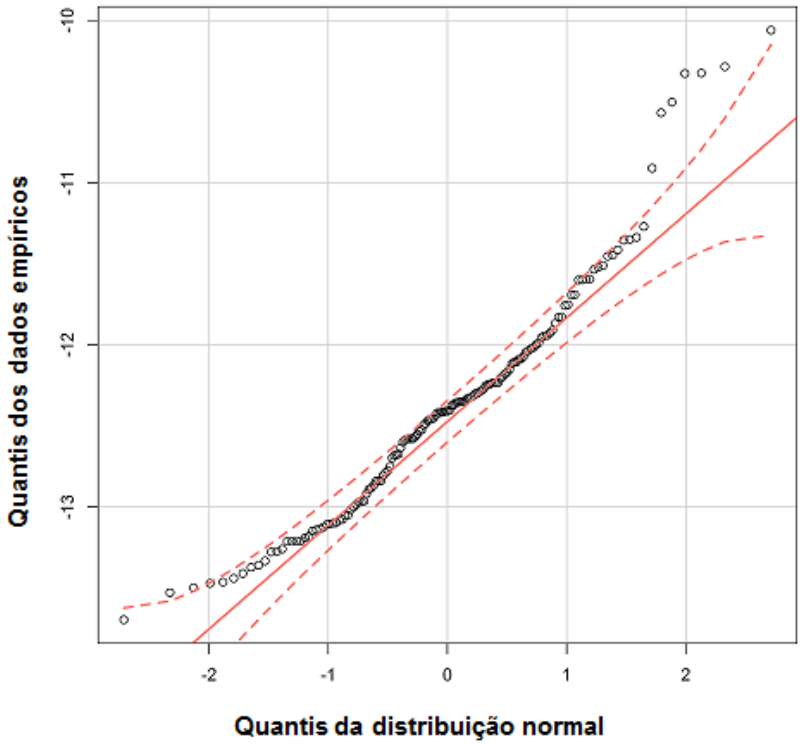

Figura 4.5 QQ-Plot da variável valor isotópico de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$).

Com um nível de confiança de 95 %, alguns pontos ficaram fora da região de confiança, dentro do qual se espera que, sendo nula a hipótese da normalidade, os dados se encaixem de forma otimizada. Para confirmar a rejeição à hipótese de normalidade, aplicou-se o teste de *Shapiro-Wilk* (SHAPIRO; WILK, 1965), cujo valor da estatística de teste (W) foi igual a 0,91968 e o respectivo *p-value* foi igual a 0,1946 confirmando o que foi observado no *QQ-plot*.

Utilizando os valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ apresentados na Tabela 4.1 (p. 70), o valor que melhor representa o $\delta^{13}C_{VPDB}$ para o bioetanol de cana-de-açúcar poderia ser proposto como sendo: ou (i) um valor único (estimador pontual); ou (ii) por um intervalo, de onde se estima o valor verdadeiro da variável aleatória a partir de um dado nível de confiança.

Devido à assimetria observada, foram utilizados "métodos robustos" de estimação estatística, que são menos afetados por valores extremos de distribuição. Após a rejeição da hipótese da normalidade, o método de kernel (ROSENBLATT, 1956; SILVERMAN, 1998) foi aplicado para a estimativa não paramétrica de uma distribuição de probabilidade.

Utilizando as informações das replicatas, dada a heterocedasticidade observada, o modelo de kernel considerado para a estimação do perfil probabilístico do bioetanol é um modelo de variável não constante (DELAIGLE; MEISTER, 2008). Escolhendo o kernel gaussiano e determinando-se a largura de banda (h) pela regra de *Silverman's* (FAN, 1991), h = 0,2623, a densidade de kernel estimada para as amostras de bioetanol de cana-de-açúcar é mostrada na Figura 4.6 (a).

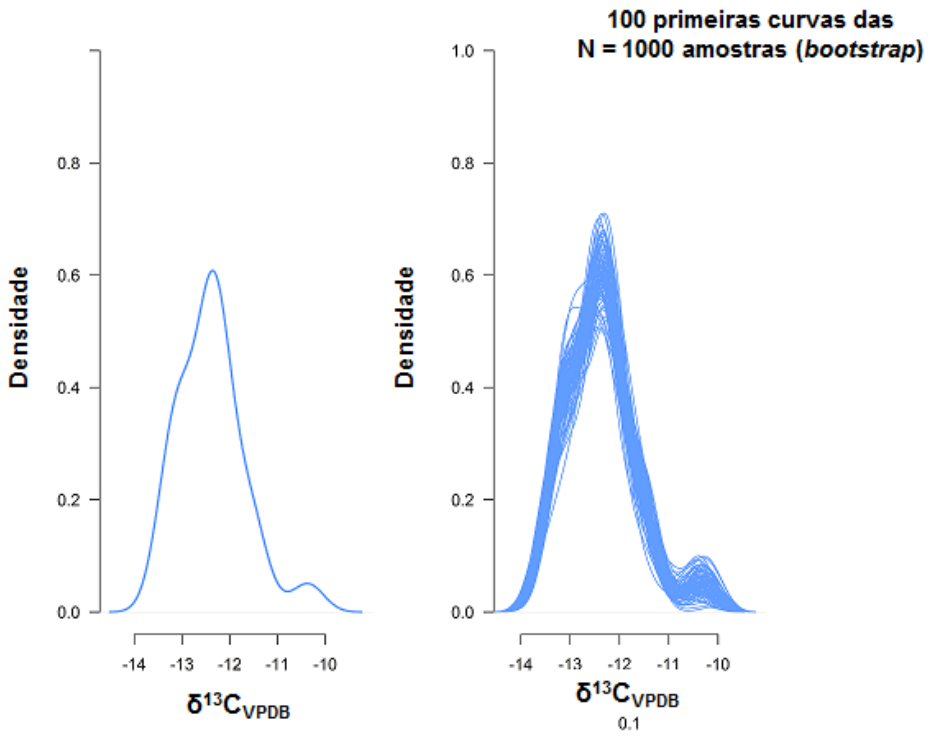

Figura 4.6 (a) Estimativa da densidade de Kernel dos valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ do bioetanol de cana-de-açúcar e (b) Estimativa da densidade de kernel das 100 primeiras curvas das amostras *bootstrap*.

É possível estimar o erro padrão da estimativa da moda da distribuição por meio de um processo de reamostragem chamado *Bootstrap*. A técnica de *bootstrap* trata a amostra observada como se esta representasse exatamente toda a população de dados. Na Figura 4.6 (b) temos as 100 primeiras curvas das N = 1000 amostras *bootstrap* utilizadas para estimação do erro padrão da moda.

Este processo de reamostragem (EFRON; TIBSHIRANI, 1993) é usado para estimar a distribuição das amostras do estimador pontual (no caso, a moda) e com elas inferir estimativas de funções amostrais que não possuem expressão analítica como, por exemplo, a variância do estimador. Consiste então em retirar uma subamostra aleatória, com reposição, de mesmo tamanho da amostra original de dados, e calcular a estatística de interesse, no caso a moda amostral. Repetindo-se o procedimento várias vezes (N), ter-se-ão N estimativas da moda com as quais são calculadas outras estatísticas de interesse, como a variância da moda (erro padrão), o intervalo de confiança, quantis, etc.

O valor isotópico com maior probabilidade associada a essa distribuição foi $\delta^{13}C_{VPDB}$ = -12,48 ‰. O intervalo de confiança *bootstrap* foi estimado de acordo com o “método percentil” (DAVISON; HINKLEY, 1997), com conseguinte intervalo de confiança amostral a partir da amostra de tamanho N, onde $Q_{0.025}$ e $Q_{0.975}$ são os limites inferior e superior do intervalo, respectivamente.

Interpretando-se os resultados, estima-se, com 95 % de confiança, que o intervalo (-12,68 ‰, -12,28 ‰) contém o valor verdadeiro da moda da distribuição do valor isotópico de carbono $\delta^{13}C_{VPDB}$ em amostras de bioetanol produzido a partir de cana-de-açúcar.

4.5.3 Estimativa do intervalo do valor isotópico para novas amostras de bioetanol de cana-de-açúcar

A estimativa da densidade de kernel pode ser vista como um perfil probabilístico da variável do valor isotópico de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$), já que se trata de uma distribuição de probabilidades estimada para esta variável aleatória baseada nas amostras coletadas. Visando estimar um intervalo esperado da variabilidade do valor isotópico para novas amostras, é necessário estimar os quantis das amostras,

centrados no ponto estimado (moda), com nível de 95 % de probabilidade, dados por: (-13,27 ‰, -13,22‰) para $Q_{0.025}$ e por (-11,80 ‰, -10,32 ‰) para $Q_{0.975}$.

Embora não seja possível estimar um intervalo de variabilidade para o valor isotópico de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$), é possível assumir o intervalo formado pelo limite inferior do quantil $Q_{0.025}$ (menor valor) e o limite superior do quantil $Q_{0.975}$ (maior valor) isto é, (-13,27 ‰, -13,32 ‰), que seja uma boa estimativa da variabilidade desta quantidade de interesse, visto que 95 % dos valores médios das amostras encontram-se dentro dessa faixa de valores isotópicos, conforme mostrado na Figura 4.7.

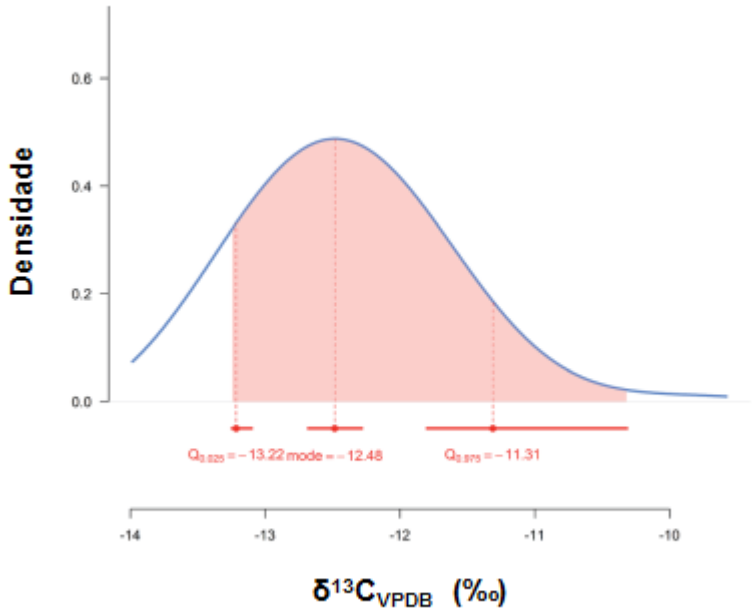

Figura 4.7 Intervalo entre o limite inferior do quantil $Q_{0.025}$ e o limite superior do quantil $Q_{0.975}$.

A capacidade dos valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ em diferenciar as amostras do bioetanol de acordo com o seu metabolismo (C3 de C4) foram demonstrados nas Tabelas 4.2 e 4.3 (p. 73 e 74). O milho é a única matéria-prima utilizada na produção de bioetanol em que os valores isotópicos podem sobrepor os valores isotópicos do bioetanol de cana-de-açúcar.

Os valores isotópicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ para o bioetanol de milho estão na faixa de (-11,02 ‰ e -10,40 ‰). As duas amostras de bioetanol de milho analisadas apresentaram valores ligeiramente distantes dessa faixa (em torno de -9,78 ‰).

Dentre as 31 amostras de bioetanol de cana-de-açucar analisadas, somente uma delas se sobrepôs à amostra de bioetanol de milho.

4.6 Conclusões

O perfil isotópico para o bioetanol no Brasil foi determinado analisando 31 amostras de bioetanol através da técnica de CG-C-EMRI, onde 95 % dos valores ficaram na faixa entre -12,68 ‰ a -12,28 ‰. Foram observadas boa congruência entre as amostras de diferentes produtores e também alta precisão e exatidão nas medições dos valores isotópicos.

O perfil probabilístico para o bioetanol de cana-de-açúcar também foi estabelecido. A análise indicou uma função de distribuição de probabilidades, sendo o seu valor mais provável (ou de maior probabilidade) igual a $\delta^{13}C_{VPDB}$ = -12,48 ‰, com um intervalo de confiança associado dado por (-12,68 ‰, -12,28 ‰).

Foi também estabelecido um intervalo de variabilidade esperado para o valor isotópico de carbono $\delta^{13}C_{VPDB}$ para novas amostras de bioetanol. Com 95 % de probabilidade espera-se que novas amostras não se encontrem fora do intervalo (-13,27 ‰, -10,32 ‰).

Essa variabilidade esperada se dá provavelmente devido aos diferentes tipos de cana-de-açúcar usados no processo de produção do etanol, devido às origens geográficas e às diferentes condições climáticas durante o plantio da mesma. A cana-de-açúcar e o milho são plantas C4 e apresentam valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ próximos, o que pode acarretar sobreposição, porém as outras matérias-primas apresentaram valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ bastante contrastantes.

CAPÍTULO 5

Avaliação da assinatura isotópica de carbono ($\delta^{13}C$) do óleo e dos ésteres metílicos do biodiesel produzido a partir da transesterificação do óleo de pinhão manso de diferentes origens geográficas do Brasil

5. Introdução

5.1 Biodiesel

No fim do século XIX, o engenheiro franco-alemão Rudolph Christian Carl Diesel, inventor do motor diesel, utilizou o petróleo cru e o óleo de amendoim em seus ensaios de performance dos motores, pois acreditava que o motor poderia ser alimentado com uma variedade de óleos vegetais. No entanto, devido ao baixo custo e à alta disponibilidade do petróleo na época, este passou a ser o combustível preferencial nesses motores (KNOTHE, G, et tal 2006). A partir de então, diminuiu-se muito o interesse pelo uso de óleos vegetais como uma fonte de combustível.

Tal interesse foi retomado na década de 70 devido às sucessivas crises no mercado internacional do petróleo aliado à busca por fontes alternativas de energia e processos sustentáveis, visando à redução da poluição ambiental e ao aquecimento global do planeta.

O desabastecimento do petróleo do mercado mundial e a preocupação com a poluição ambiental incentivaram o desenvolvimento de processos de transformação de óleos e gorduras em derivados com propriedades físico-químicas mais próximas às dos combustíveis fósseis, visando à substituição total ou parcial destes (CASTANHEIRA *et al*, 2014). Assim surgiu a ideia da transesterificação dos óleos vegetais com etanol para produzir um biocombustível, o biodiesel.

O biodiesel, assim como o etanol combustível, representa uma alternativa renovável e ambientalmente segura aos combustíveis fósseis (KNOTHE, 2010). Os biocombustíveis, por terem origem vegetal, contribuem para o ciclo do carbono na atmosfera sendo assim considerados renováveis.

O caráter renovável do biodiesel está apoiado no fato que as matérias-primas utilizadas para a sua produção são provenientes de plantas oleaginosas que, ao contrário do petróleo que provém de fonte não renovável, podem ser obtidos

mediante práticas agrícolas sustentáveis (AVINASH; SUBRAMANIAM; MURUGESAN, 2014).

O biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira, no ano de 2005, pela Lei 11097 de 13 de janeiro de 2005 e o governo federal atribuiu à Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) a responsabilidade de fiscalizar a qualidade do biodiesel que o definiu como um “Biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente os combustíveis de origem fóssil” (BRASIL, 2005).

A ANP determinou no período de 2005 a 2007 que o biodiesel fosse utilizado de forma facultativa misturada ao óleo diesel mineral na proporção máxima de 2 % de biodiesel para 98 % de diesel, formando o chamado combustível B2. Sua adição ao óleo diesel nesta proporção passou a ser obrigatória em janeiro de 2008 (ROCHA *et al*, 2008). Em 2013, esta proporção aumentou para 5 % de biodiesel no diesel (B5) e desde novembro de 2014 para 7 % (B7). Com o B7, o Brasil pode tornar-se o segundo maior produtor global de biodiesel, com mercado projetado em 4,2 bilhões de litros, atrás apenas dos Estados Unidos, com produção de cerca de 4,5 bilhões de litros (CANAL DA BIOENERGIA, 2015).

Quimicamente, o biodiesel pode ser definido como um combustível alternativo constituído por ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, preferencialmente ésteres metílicos e etílicos, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal (MEHER; VIDYA; NAIK, 2006).

5.2 Matérias-Primas

As matérias-primas utilizadas para a produção do biodiesel podem ser óleos e gorduras de origem animal e vegetal assim como óleos e gorduras residuais (Moretto e Fett, 1986). Todos os óleos vegetais, enquadrados na categoria de óleos fixos ou triglicerídeos, podem ser transformados em biodiesel. Dessa forma, poderiam constituir matéria-prima para a produção de biodiesel, os óleos de várias espécies vegetais: amendoim, milho, soja, polpa do dendê, amêndoa do coco de dendê, caroço de algodão, amêndoa do coco de babaçu, semente de girassol, baga de

mamona, semente de canola, semente de pinhão manso, entre muitos outros vegetais em forma de sementes, amêndoas ou polpas (SINGH; SINGH, 2010). Dentre as principais matérias-primas do Brasil as mais comuns são soja, milho, algodão, babaçu e palma.

Os óleos e gorduras de animais apresentam estruturas químicas semelhantes às dos óleos vegetais, sendo moléculas triglicerídeas de ácidos graxos. Desta forma, as gorduras animais também podem ser transformadas em biodiesel. Como exemplos de gorduras animais para produção de biodiesel temos o sebo bovino, óleos de peixes, banha de porco, entre outras. Além dos óleos e gorduras, constituem também matéria-prima para a produção de biodiesel os óleos e gorduras residuais, resultantes de processamentos domésticos, comerciais e industriais.

Dentre as matérias-primas mais utilizadas para a produção do biodiesel, a soja apresenta maior destaque seguida da gordura animal, sendo a mais empregada o sebo bovino (MARTINS *et al*, 2011). O sebo bovino é mais viável economicamente. Além de agregar valor à cadeia da carne bovina, seu emprego na fabricação de biodiesel contribui para que seja dado um uso ambientalmente correto a essa matéria-prima, que antes chegava a ser um rejeito e nem sempre tinha o melhor destino, sendo por vezes enterrada, gerando contaminação do solo.

A escolha da matéria-prima para a produção de biodiesel depende largamente de fatores geográficos, pois dependendo da origem e da qualidade da matéria-prima, mudanças no processo de produção podem ser necessárias. Também é levado em conta o potencial para utilização na agricultura familiar, de forma a gerar empregos contribuindo assim para o desenvolvimento econômico e inclusão social (KNOTHE; VAN GERPEN; KRAHL, 2006).

As matérias-primas potencialmente produtoras de biodiesel podem apresentar diferentes relações entre os compostos glicerídicos e não-glicerídicos, assim como, os ácidos graxos constituintes podem ter menor ou maior número de carbonos; nenhuma, uma ou mais duplas ligações (insaturações), de maneira que a qualidade do biodiesel obtido apresenta relação direta com a natureza e a qualidade da matéria-prima, como também, com as condições em que esta foi produzida (Moretto & Fett, 1986).

A investigação de matérias-primas de menor custo também representa uma estratégia associada à produção que tem sido utilizada para melhorar a viabilidade econômica do biodiesel. No entanto, a composição destas matérias-primas

alternativas pode exigir modificações das tecnologias existentes para a produção de biodiesel de qualidade aceitável (KNOTHE; VAN GERPEN; KRAHL, 2006).

No Brasil, em função do clima tropical e subtropical e da área de terra disponíveis, são cultivadas diversas plantas oleaginosas (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2008) que têm potencial para serem utilizadas como matéria-prima na produção de biodiesel, dentre as quais podemos destacar a semente de pinhão manso.

5.2.1 Pinhão manso

O nome científico do pinhão manso é *Jatropha curcas*, espécie da família das euforbiáceas, um arbusto grande, predominante na América tropical. A literatura relata inúmeras aplicações e o seu maior emprego está na medicina popular (como purgativo, e na cura de doenças como a paralisia e o reumatismo) (ECOÓLEO, 2014). No entanto, o alto teor de óleo de suas sementes, aliado à característica de queima sem liberação de fumaça, faz com que este se destaque como alternativa no fornecimento de matéria prima para a síntese de biocombustíveis.

O teor médio de óleo encontrado nas sementes está em torno de 34 %. Dentro das sementes de cor negra encontra-se um albúmen branco rico em óleo, em torno de 60,8 % composto basicamente por 14,3 % de ácido palmítico, 5,1 % de ácido esteárico, 41,1% de ácido oleico e 38,1% de ácido linoleico (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2008).

A planta e as suas sementes são tóxicas. Entre as principais substâncias tóxicas presentes no pinhão manso destacam-se a curcina - proteína semelhante à ricina (encontrada na mamona) e o éster de forbol 12- deoxi-16-Hidroxiforbol (STIRPE *et al*, 1976). Os ésteres de forbol são derivados de diterpenos tetracíclicos e a ricina é uma proteína presente nas sementes da mamona (*Ricinus communis L*) considerada como umas das mais potentes toxinas de origem vegetal conhecida. Contudo, vários trabalhos demonstram que a atividade tóxica das sementes, bem como do óleo de *Jatropha curcas*, deve-se, na verdade, à presença de ésteres de forbol e não da curcina (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2008).

Da análise de produtividade estimada para as diversas culturas, verifica-se que o pinhão manso apresenta uma expectativa de produtividade (cerca de 6.000 kg de semente com aproximadamente 2.000 litros de óleo) muito mais atrativa que as

demais culturas (KOH; GHAZI, 2011). A Tabela 5.1 apresenta a produtividade de diversas oleaginosas, incluindo o pinhão manso.

Além disso, o pinhão manso é de fácil cultivo e apresenta variações pouco significativas de acidez o que acarreta à possibilidade de armazenamento das sementes por longos períodos de tempo.

Tabela 5.1 Produtividade de oleaginosas no Brasil e indicadores de rendimento.

Oleaginosas	Origem do Óleo	Produtividade (Kg/ha)	Teor de Óleo (% Kg)	Rendimento (Prod. de Óleo) Kg/ha/ano
Algodão caroço	Grão	3.000	12%	360
Amendoim em Casca	Grão	1.600	39%	624
Babaçu	Amêndoa	1.600	62%	992
Canola	Grão	1.700	39%	663
Dendê	Amêndoa	25.000	20%	5000
Gergelim	Grão	650	50%	325
Girassol	Grão	1.500	41%	615
Mamona sequeiro	Grão	1.500	45%	675
Mamona irrigada	Grão	5.000	45%	2250
Milho	Grão	3.100	6%	186
Pinhão Manso	Grão	6.500	38%	2470
Soja	Grão	2.300	20%	460

Fonte: (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2008)

Atualmente há iniciativas para desenvolver e utilizar o pinhão manso na produção do biodiesel por apresentar, além da elevada produtividade, as seguintes vantagens: i) não é utilizado como alimento; ii) possui baixo custo de implantação e manutenção agrícola; iii) intensivo em mão de obra não qualificada (colheita manual) e iv) cultura perene (produção durante todo o ano) (MENDES; COSTA, 2010).

5.2.2 Óleo de Pinhão manso

O óleo de pinhão manso representa o produto de maior valor desta planta. O óleo das sementes tem propriedades valiosas e adequadas a produção de biodiesel,

entre elas apresenta uma baixa acidez, uma boa estabilidade oxidativa e um alto índice de cetano (TAPANES *et al*, 2008).

A baixa acidez, como já mencionado, permite a armazenagem por longos períodos de tempo, sem os inconvenientes da deterioração do óleo por aumento da acidez livre, conforme acontece com os frutos de dendê ou de macaúba, que devem ser processados o mais depressa possível.

A maior estabilidade quando comparado ao óleo de soja, é decorrente das ligações insaturadas existentes nas cadeias carbônicas provenientes dos ácidos graxos. A estabilidade oxidativa do biodiesel está diretamente relacionada ao grau de insaturação dos alquilésteres presentes, como também, com a posição das duplas ligações na cadeia carbônica. A concentração de alquilésteres com alto grau de insaturação varia de acordo com a matéria prima utilizada na produção do biodiesel. Quanto maior o número de insaturações, mais suscetível está a molécula à degradação tanto térmica quanto oxidativa, formando produtos insolúveis que ocasionam problemas de formação de depósitos e entupimento do sistema de injeção de combustível do motor. Por outro lado, antioxidantes naturais dos óleos vegetais, como por exemplo, os tocoferóis, podem promover uma maior estabilidade à oxidação (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

O óleo de pinhão manso tem um índice de cetano mais elevado comparado ao diesel que o torna uma boa alternativa de combustível sem modificações necessárias no motor (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). O número de cetanos é indicativo do tempo de atraso na ignição de combustíveis para motores do ciclo diesel, logo reflete a qualidade da ignição do combustível. Quanto maior o número de cetanos mais curto será o tempo de ignição.

Na Tabela 5.2 estão apresentados a composição química dos ácidos graxos de óleos de diferentes matérias-primas, incluindo o óleo de pinhão manso (KOH; GHAZI, 2011).

Tabela 5.2 Composição média de ácidos graxos de diferentes óleos vegetais.

Ácidos Graxos	Óleo de Pinhão manso	Óleo de Girassol	Óleo de Soja	Óleo de Palma
Láurico (C12:0)	-	0,5	-	-
Mirístico (C14:0)	-	0,2	0,1	-
Palmítico (C16:0)	14,2	4,8	11,0	40,3
Palmitoleico (C16:1)	1,4	0,8	0,1	-
Esteárico (C18:0)	6,9	5,7	4,0	3,1
Oleico (C18:1)	43,1	20,6	23,4	43,4
Linoleico (C18:2)	34,4	66,2	53,2	13,2
Linolênico (C18:3)	-	0,8	7,8	-
Aráquico (C20:0)	-	0,4	0,3	-
Behênico (C22:0)	-	-	0,1	-
Saturados (%)	21,1	11,6	15,5	43,4
Insaturados (%)	78,9	88,4	84,5	56,6

Fonte: KOH; GHAZI, 2011.

Para garantir a qualidade do biodiesel é necessário estabelecer padrões de qualidade, objetivando fixar teores limites dos contaminantes que não venham prejudicar a qualidade das emissões da queima, bem como o desempenho, a integridade do motor e a segurança no transporte e manuseio.

A qualidade do biodiesel apresenta relação direta com a natureza e a qualidade da matéria-prima. Na Tabela 5.3 são apresentados as propriedades do biodiesel de diferentes fontes de matéria-prima (pinhão manso, canola e milho) e os valores de referência especificados pela norma ASTM D 6751-02 (*Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock*) (KOH; GHAZI, 2011).

Tabela 5.3 Propriedades do biodiesel de pinhão manso, canola e milho.

Propriedades	Biodiesel pinhão manso	Biodiesel canola	Biodiesel Milho	Padrão de Biodiesel ASTM D 6751-02
Viscosidade (mm^2/s)	2,35 - 2,47	2,56 - 2,84	2,45 - 2,56	1,9 – 6,0
Número de Cetano	60,74 - 63,27	55,90 - 56,10	58,37 - 59,00	47 (mín)
Índice de Acidez mg/KOH/g	0,61 - 0,66	-	-	0,8 (máx)

KOH; GHAZI, 2011.

5.3 Transesterificação

O óleo vegetal *in natura* não deve ser usado como substituto do diesel sem que haja nenhuma modificação no motor, pois a sua combustão direta leva a formação de goma devido à oxidação e à polimerização através das ligações duplas dos triglicerídeos durante a combustão, podendo causar sérios problemas ao motor. Com o intuito de adaptar os combustíveis, os óleos vegetais têm sido modificados, pois dessa forma esses problemas podem ser contornados através de reações químicas que modificam a estrutura molecular dos óleos vegetais e gorduras animais (MA; Hanna, 1999).

Existem diferentes rotas tecnológicas para a transformação química do óleo vegetal para a produção de biodiesel, tais como: transesterificação, esterificação, craqueamento e outras.

Na literatura há uma variedade de metodologias tanto para esterificação quanto para transesterificação de óleos e gorduras e dentre eles temos o método proposto por *Metcalfe et al.* (1966) (METCALFE; SCHMITZ; PELKA,1966; METCALFE; WANG, 1981), que envolve catálise ácida.

A transesterificação é o método mais comum para a produção de biodiesel, devido à sua simplicidade, e tem sido aplicada industrialmente para converter o óleo vegetal em biodiesel de forma rápida, mais eficiente e menos dispendiosa do que os outros métodos (SHAHID; JAMAL, 2011; BORGES; DÍAZ, 2012; SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998; SHAH; SHARMA; GUPTA, 2004).

Na reação de transesterificação o principal produto dessa reação é o biodiesel (éster de ácido graxo), enquanto a glicerina é o principal subproduto de valor agregado para a indústria cosmética e farmacêutica. Nessa reação, o triglicerídeo reage com um álcool simples (metanol ou etanol), formando ésteres (metílico ou etílico), que constituem o biodiesel, e glicerol. Como triglicerídeos, podem ser usados óleos de diversas oleaginosas, de acordo com a maior disponibilidade de cada região, e também gorduras animais. O álcool é adicionado em excesso a fim de permitir a formação de uma fase separada de glicerol, e deslocar o equilíbrio para um máximo rendimento de biodiesel, devido ao caráter reversível da reação. Pode ser utilizada catálise ácida, básica ou enzimática, ou utilizando fluidos supercríticos (KUSDIANA; SAKA, 2001), sendo a catálise básica a mais usada para a produção industrial. A Figura 5.1 mostra a reação de transesterificação.

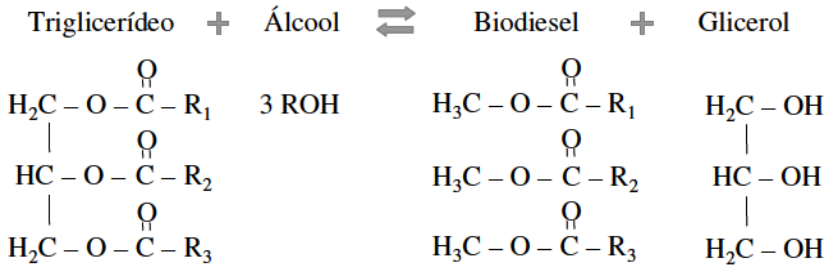

Figura 5.1 Reação de transesterificação.

5.4 Ésteres Metílicos

O uso crescente do biodiesel leva à necessidade de afirmar a sua qualidade como biocombustível. Sendo assim, o controle de qualidade acompanhado de uma política fiscalizadora são ferramentas essenciais para garantir a confiança desse biocombustível. O controle de qualidade do biodiesel final é fundamental e incontornável, já que o não cumprimento dos parâmetros das normas pode trazer problemas não só ao motor como também a qualquer outro componente do sistema do combustível. Um biodiesel de má qualidade poderá dar origem a consequências drásticas, sendo a sua análise um fator crucial na prevenção de possíveis problemas.

O teor de ésteres metílicos no biodiesel é um parâmetro a ser determinado na caracterização do biodiesel (SHARMA; SINGH; UPADHYAY, 2008). De acordo com a norma europeia EN 14103:2011 (2011) a caracterização do biodiesel pode ser feita através da sua composição de ésteres de ácidos graxos utilizando a cromatografia à gás acoplada a detector por ionização de chama (CG-DIC) para a identificação e quantificação dos ésteres constituintes do mesmo, na forma de éster metílico de ácido graxo (FAME - *Fatty Acid Methyl Esters*), com cadeias de 14 a 18 carbonos, saturados e insaturados, entre eles: o C16:0 (palmitato de metila), o C16:1 (palmitoleato de metila), o C18:0 (estearato de metila), o C18:1 (oleato de metila), o C18:2 (linoleato de metila) e o C18:3 (linolenato de metila), apresentados na Figura 5.2.

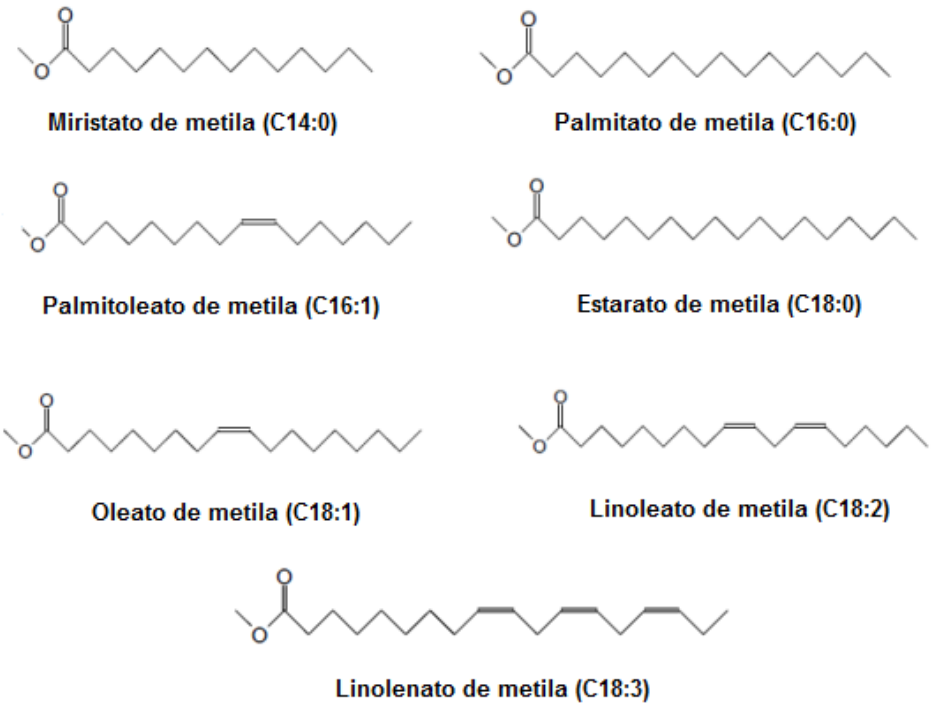

Figura 5.2 Ésteres metílicos de ácidos graxos, com cadeias de 14 a 18 carbonos.

5.4.1 Assinatura Isotópica dos Ésteres Metílicos

A técnica de CG-C-EMRI tem sido usada nos estudos dos ésteres metílicos de ácidos graxos e tem sido muito explorada na área de alimentos, pois permite identificar possíveis adulterações nos óleos vegetais (WOODBURY *et al*, 1995) e as medições isotópicas de carbono combinadas com as medições de outros isótopos estáveis permitem identificar a origem geográfica dos óleos (HRASTAR *et al*, 2009; SPANGENBERG; OGRINC, 2001; WOODBURY; EVERSHED; ROSSELL, 1998).

A determinação da autenticidade dos óleos não é considerada uma tarefa fácil, pois as características de uma mistura de óleos podem ser bem semelhantes ao óleo puro e a análise da determinação da razão isotópica pode minimizar essa dificuldade. O milho, por exemplo, é uma planta C4 enquanto que a maioria das outras oleaginosas apresenta via biossintética C3. Logo, qualquer adição ou substituição a partir de outra fonte no óleo de milho implicará num valor isotópico de $\delta^{13}C$ mais negativo do que para o óleo de milho puro (WOODBURY *et al*, 1995).

Na Tabela 5.4 são apresentados os valores de $\delta^{13}C$ para os óleos de diferentes origens.

Tabela 5.4 Razão isotópica de carbono ($\delta^{13}C$) de óleos de diferentes origens.

Óleo	Valor Médio ($\delta^{13}C$)	Faixa $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰)
Milho	-14,95	(-13,71; -16,36)
Outros vegetais	-28,99	(-25,28; -32,39)
Cereal	-31,26	(-30,38; -32,39)
Peixe	-26,66	(-25,37; -27,95)
Animal	-30,28	(-27,56; -32,08)

KELLY, RHODES, 2002.

Dentre os óleos vegetais comercializados mundialmente, o azeite de oliva é um dos mais importantes e recebe diversas classificações dependendo da origem (ANGEROSA *et al*, 1999), da variedade do fruto e do grau de prensagem, o que agrega valor ao produto. A prática da adulteração do azeite é comum, e ocorre com a mistura de óleos mais baratos, como adição de óleo de girassol. Spangenberg (1998) investigou a autenticidade do azeite de oliva através da determinação da razão isotópica por AE-EMRI e os valores isotópicos de $\delta^{13}C$ do azeite estão na faixa de (-27,7 a -30,6 ‰), característico de planta C3 e que permite diferenciar os tipos de óleos e identificar as possíveis adulterações.

Angerosa *et al*. (1997) mediante a determinação da razão isotópica identificaram diferenças no valor isotópico no azeite de oliva bruto e o refinado, permitindo assim a diferenciação dos mesmos. Royer *et al*. (1999) examinaram a autenticação dos azeites de oliva produzidos na Grécia e os valores isotópicos de $\delta^{13}C$ dos ácidos graxos individuais, o que permitiu a identificação com relação a origem geográfica, por meio das diferenças no valor isotópico. Dessa forma, pela determinação da composição isotópica dos óleos vegetais, é possível identificar a fonte da matéria-prima (planta C3 ou C4) e a sua origem geográfica. Panetta (2011) relata a análise isotópica de carbono ($\delta^{13}C$) como um meio alternativo para identificação de possíveis adulterações e demonstra a análise de ésteres metílicos por CG-C-EMRI e sua aplicação na autenticação dos mesmos.

5.5 Experimental

5.5.1 Reagentes

O material de referência éster metílico C18:0 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 23,24 ± 0,01 ‰) da Universidade de Indiana (Bloomington, EUA) (SCHIMMELMANN, 2014) foi utilizado para calibração do sistema CG-C-EMRI. Para a validação do método utilizou-se o MRC de biodiesel de soja produzido em cooperação entre o *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e o Inmetro - SRM 2772 (INMETRO, 2012).

Os padrões de éster metílico C22:0 (behênico ou ácido docosanóico, Sigma-Aldrich, pureza acima de 99 %, lote 075k1760) e de C19:0 (nonadecanoato de metila, Sigma-Aldrich, pureza acima de 98 % GC, lote bcbl8348) foram usados como *spiking* e padrão interno, respectivamente.

Na reação de transesterificação dos óleos de pinhão manso foi utilizado metanol (Tedia Brasil, grau HPLC, pureza mínima 99,9 %), KOH (Sigma-Aldrich) e mistura BF_3-metanol (trifluoreto de boro em metanol, Supelco).

5.5.2 Amostras

Foram obtidas seis amostras de sementes de pinhão manso cedidas pela Embrapa Solos (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) de diferentes origens geográficas do Brasil devidamente identificadas, exceto uma sem identificação da origem e três amostras do óleo de pinhão manso oriundas de São Paulo, identificadas como 100, 101 e 102, conforme apresentado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Amostras de sementes e óleo de pinhão manso.

Código da Amostra	Origem (Cidade/Estado)	Tipo de Amostra
264	Dourados	Semente de pinhão manso
201	Lavras	Semente de pinhão manso
136	Maranhão	Semente de pinhão manso
299	Rio Grande do Sul	Semente de pinhão manso
112	Petrolina	Semente de pinhão manso
813	Desconhecido	Semente de pinhão manso
100	São Paulo	Óleo de pinhão manso
101	São Paulo	Óleo de pinhão manso
102	São Paulo	Óleo de pinhão manso

5.5.3 Equipamentos

As análises isotópicas dos óleos de pinhão manso foram realizadas no analisador elementar Flash EA™1112 acoplado a espectrômetro de massas de razão isotópica DeltaPlus XL com interface ConFlo III (*Thermo Fisher Scientific*, Bremen, Alemanha), do Laboratório de Isótopos Estáveis do Cenpes/Petrobras.

As análises isotópicas do biodiesel foram realizadas no espectrômetro de massas para razão isotópica modelo Delta V Plus (*Thermo Fisher Scientific*, Bremen, Alemanha) acoplado a um cromatógrafo a gás modelo 7890A (Agilent Technologies) com interface de combustão modelo GC Combustion III (*Thermo Fisher Scientific,* Bremen, Alemanha), do Laboratório de Isótopos Estáveis do Cenpes/Petrobras.

A identificação e a quantificação do teor dos ésteres metílicos do biodiesel produzido a partir da transesterificação do óleo de pinhão manso foram realizadas em sistema de cromatógrafo a gás GC-2010 (Shimadzu, Tóquio, Japão) acoplado a espectrômetro de massas do tipo quadrupolo, GCMS-QP2010 (Shimadzu, Tóquio, Japão).

5.5.4 Obtenção dos óleos de pinhão manso por extração com solvente

5.5.4.1 Análise dos Brancos

Um estudo foi realizado para verificar se o processo de extração do óleo da semente de pinhão manso poderia acarretar alguma contaminação do branco. Para isso, foi efetuada a lavagem do extrator do soxhlet durante 4 horas com hexano.

Todo o aparato de extração (soxhlet, balão e condensador), as vidrarias, a lã acrílica (marca VIGO AR) e o papel de filtro foram lavados várias vezes com hexano.

O hexano da lavagem (branco) desses aparatos foi evaporado em evaporador rotatório até volume de 1 mL e analisado por Cromatografia à gás Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM) nas mesmas condições do método para determinação do teor de ésteres metílicos em biodiesel (Item **5.5.6.1**), além do hexano utilizado para lavagem e extração da semente.

5.5.4.2 Extração do óleo de pinhão manso

As sementes de pinhão manso de regiões diferentes foram secas em estufa, por uma hora, e moídas em triturador da marca IKA (A11B, 50/60 Hz, 160 W). Depois de trituradas, aproximadamente 30 g das sementes foram colocadas no extrator de soxhlet empacotado com a lã acrílica e papel de filtro para evitar que elas passassem para balão. Aproximadamente 500 mL de hexano foram utilizados como solvente de extração e temperatura de aproximadamente 70 °C por 3 horas. As extrações foram feitas em triplicata, simultaneamente em três (3) extratores de soxhlet diferentes.

Após a extração, a amostra foi filtrada para retirar os resíduos sólidos provenientes das sementes que foram arrastadas para o balão e depois o hexano foi evaporado em evaporador rotatório, restando somente o óleo de pinhão manso.

Em seguida o óleo foi pesado para o cálculo do rendimento. O teor de óleo extraído foi calculado pela razão entre a massa de óleo obtida e a massa de semente triturada. Os resultados são apresentados na Tabela 5.6 (p. 100).

5.5.5 Biodiesel a partir da transesterificação a partir do óleo de pinhão manso

A transesterificação dos óleos de pinhão manso foi realizada com base no método de *Metcalfe* com algumas modificações, utilizando um banho ultrassônico.

Foram pesados aproximadamente 0,8 g de cada óleo de pinhão manso e aproximadamente 50 mg do padrão C22:0, adicionados 5,0 mL de KOH metanólico (1 mol/L) e colocados no ultrassom (ELMASONIC 30 H) por 3h a 70°C, frequência ultrassônica de 80 kHz e potência ultrassônica de pico de 480 W. Em seguida foram adicionados 5,0 mL de solução metanólica de BF_3 e deixados no ultrassom por mais 1 hora. As reações foram feitas em frascos de 25 mL (marca Schott). Ao término da reação, foram adicionados 1,0 mL de solução de NaCl (supersaturado). A mistura foi transferida para um funil de separação juntamente com aproximadamente 10 mL de hexano. Agitou-se o funil e em seguida foi deixado em repouso para a separação das fases. Em seguida, retirou-se a parte de hexano com o auxílio de uma micropipeta e o mesmo foi evaporado em banho a 60 °C, obtendo-se, assim, o biodiesel.

5.5.6 Métodos

5.5.6.1 Análise do teor de ésteres metílicos do biodiesel obtido a partir da transesterificação do óleo de pinhão manso por CG-EM

A determinação do teor de ésteres metílicos do biodiesel foi realizada de acordo com a Norma EN 14103:2011 (*Determination of ester and linolenic acid methyl ester contentes* - Determinação de ésteres totais e éster metílico de ácido linolênico em FAME) e o método devidamente validado segundo DOQ-CGCRE-008 (2011).

5.5.6.1.1 Validação do método para determinação do teor de ésteres metílicos do biodiesel por CG-EM

Na validação foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, limite de repetibilidade e precisão intermediária.

Preparou-se uma solução estoque em um balão volumétrico com os padrões de ésteres metílicos (C18:1, C18:2 e C18:3 com 70.000 ppm; C16:0 e C18:0 com

50.000 ppm e C14:0 e C16:1 com 2.500 ppm) em tolueno. A solução foi preparada gravimetricamente a partir dos padrões individuais de cada éster metílico, denominada de solução estoque. A partir desta solução, foram preparadas 8 diluições, utilizando respectivamente 1000 µL , 860 µL, 720 µL , 580 µL, 440 µL, 300 µL, 160 µL, 20 µL da solução estoque. Estas soluções foram utilizadas para a otimização do método cromatográfico de modo a obter uma resolução adequada entre os ésteres metílicos, confirmada pelos cromatogramas.

As análises de identificação e quantificação do teor dos ésteres metílicos do biodiesel produzidas a partir da transesterificação do óleo de pinhão manso foram realizadas por CG-EM nas seguintes condições: razão de *splitless* 1:100; volume de injeção de 1 µL; temperaturas do injetor e detector em 250 °C, coluna cromatográfica Rtx-Wax - polietilenoglicol (30m x 0,25 mm x 0,32 µm), marca Varian Inc (Walnut, CA, EUA); programação do forno: 60 °C (2 min), 200 °C (10 °C/min), 240 °C (5,0 °C/min; 7min), sendo o tempo total de análise de 31 minutos. Foi usado o hélio 6.0 como gás de arraste com fluxo constante de 30 mL/min. O modo SCAN, na faixa de massa de 40 a 500 Daltons foi utilizado para confirmação dos espectros de massas.

5.5.6.2. Calibração do sistema AE-EMRI

Para calibração do gás de referência CO_2 utilizou-se o padrão de referência internacional NBS-22, $\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 30,031 ± 0,043 ‰ (IAEA, Viena, Áustria, 2009), nas seguintes condições: temperaturas de 900 °C e 680 °C do reator de oxidação e redução, respectivamente. A temperatura do forno foi mantida a 45 °C.

5.5.6.3 Análise isotópica do óleo de pinhão manso de diferentes origens geográficas por AE-EMRI

Aproximadamente 0,5 mg de cada amostra de cada amostra do óleo de pinhão manso foi pesada em cápsulas de estanho e colocadas no amostrador automático.

5.5.6.4 Análises dos ésteres metílicos do biodiesel por CG-C-EMRI

As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna cromatográfica: DB-23 - 50 % cianopropril, 50 % dimetilolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), marca *J&W Scientifc* (Califórnia, EUA), volume de injeção de 0,1 µL no modo *splitless*; temperatura do injetor de 250 °C, fluxo da coluna capilar ajustado para 1,0 mL/min utilizando hélio como gás de arraste; programação do forno: 60 °C até 200 °C (rampa de 7 °C/min) → 216 °C rampa de 2 °C/min) por 2 min, sendo o tempo total de análise de 32 minutos.

5.5.6.5 Parâmetros do Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica

Alto vácuo: 10-6 mBar; massa/carga para os íons dos isótopos de carbono monitorados: *m/z* 44 e *m/z* 45 e voltagem de ionização 124eV. Temperatura do forno de combustão: 950 °C. Foram submetidos no sistema 5 (cinco) pulsos do gás de referência CO_2, sendo três no início da corrida e dois no final, de 30 segundos cada. Tempo total de análise de 1950 s. Tempo de backflush: 950 s.

5.6 Resultados e Discussão

5.6.1 Extração do óleo de pinhão manso

Apesar da tecnologia existente para a extração do óleo não ser complexa, o método de extração do óleo das sementes de pinhão manso foi otimizado de forma a garantir um maior rendimento e menor contaminação da amostra final. Sendo o óleo de pinhão manso a matéria-prima utilizada na obtenção do biodiesel, a extração foi realizada tomando os devidos cuidados para evitar contaminações cruzadas e assim diminuir a possibilidade de interferentes no biodiesel final visto que a técnica de espectrometria de massas de razão isotópica é mais sensível quando comparada a espectrometria de massas habitual.

A extração foi caracterizada pelo rendimento em óleo (%). Os rendimentos para cada replicata de amostra de sementes de pinhão manso estão apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 Rendimentos da extração do óleo (%) para cada amostra de sementes de pinhão manso.

Código e Região da semente	Extração	Massa das sementes (g)	Massa de óleo (g)	Rendimento (%)	Rendimento médio (%)
DOURADOS (264)	1	30,1281	9,1750	30,4	32,1
	2	30,1027	10,5380	35,0	
	3	30,5500	11,6010	37,9	
LAVRAS (201)	1	30,0174	10,7690	35,9	35,2
	2	30,1610	9,0611	30,1	
	3	30,3570	12,0663	39,7	
MARANHÃO (136)	1	30,5856	13,0807	42,8	42,7
	2	30,0550	11,5745	38,5	
	3	30,1114	14,2409	47,3	
RIO GRANDE DO SUL (299)	1	30,7965	14,1387	45,9	43,7
	2	30,5889	11,1104	36,3	
	3	30,6230	14,9845	48,9	
PETROLINA (112)	1	30,0762	9,772	0,3249	34,7
	2	30,1463	8,7472	0,2902	
	3	30,3139	12,9422	0,4269	
813	1	30,5682	13,7824	0,4509	40,3
	2	30,2924	11,8396	0,3908	
	3	30,0781	11,0951	0,3689	

Os rendimentos em óleo obtidos foram significativos (> 30 %) para todas as amostras. Os resultados encontrados possibilitaram uma avaliação geral do método de extração otimizado frente às variáveis temperatura e tempo de extração e o mesmo pode ser considerado como uma potencial rota para obtenção do óleo de pinhão manso em escala laboratorial.

5.6.2 Transesterificação do óleo de pinhão manso

Na síntese do biodiesel, um fator importante foi levado em consideração sobre o uso dos reagentes utilizados na transesterificação dos óleos, como o caso do metanol. A assinatura isotópica do metanol depende da sua origem, apresentando valores mais negativos de $\delta^{13}C$, ou seja, cada metanol poderá apresentar um valor isotópico diferente do outro. Sendo assim, utilizou-se o metanol do mesmo frasco (lote) para todas as reações de transesterificação. O metanol usado na transesterificação influencia o valor isotópico dos ésteres metílicos por conta da adição de um carbono. Em virtude disso, a razão isotópica de $\delta^{13}C$ do metanol foi determinada por AE-EMRI ($\delta^{13}C$ = - 38,412 ‰) e os valores isotópicos de $\delta^{13}C$ dos ésteres metílicos foram corrigidos de acordo com a equação 5.1, onde $\delta^{13}C_{Medido}$ é o valor isotópico medido para o éster metílico, $\delta^{13}C_{MeOH}$ é o valor isotópico do metanol determinado previamente e *n* corresponde ao número de carbonos do éster metílico.

$$\delta^{13}\mathrm{C}_{\mathrm{Corrigido}} = \frac{[\delta^{13}C_{Medido} \times (1+n) - \delta^{13}C_{MeOH}]}{n}$$

Equação 5.1

As análises isotópicas devem seguir todos os cuidados com relação às variações isotópicas, pois devem ser identificadas se as mesmas são provenientes do processo ou da própria amostra. Para evitar dúvidas, a rastreabilidade deve ser assegurada em todo o processo de medição.

Logo, o padrão de éster metílico C22:0, denominado como *spiking*, foi adicionado ao óleo a ser transesterificado, participando então do meio reacional durante o processo, em que pode ocorrer fracionamento isotópico.

A adição de padrão (*spiking*) (EDER, 1995) é um método que consiste em adicionar quantidades conhecidas do analito na amostra com o intuito de verificar possíveis fontes e/ou a ocorrência de fracionamento isotópico, visto que o padrão é submetido a todas as fases do processo de obtenção do biodiesel.

A escolha do C22:0 como *spiking*, foi em virtude do mesmo não estar presente nas amostras do óleo de pinhão manso e por eluir separadamente e distante dos outros componentes da amostra. O seu valor isotópico foi determinado previamente por AE-EMRI ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -27,09 ± 0,06 ‰), e usado para normalizar os dados dos

ésteres metílicos dos óleos de pinhão manso. Os resultados dos valores isotópicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) do padrão C22:0 são apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 Valores isotópicos do padrão C22:0 (*spiking*).

C22:0	$\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰)
Análise 1	-26,95
Análise 2	-27,02
Análise 3	-26,98
Análise 4	-27,00
Análise 5	-27,16
Análise 6	-27,13
Análise 7	-27,07
Análise 8	-27,04
Análise 9	-27,05
Análise 10	-27,07
Análise 11	-27,01
Média (‰)	-27,04
Média normalizada (NBS22) (‰)	-27,09
Desvio Padrão (‰)	0,06
Coeficiente de Variação (CV) (%)	0,23

5.6.3 Análise dos ésteres metílicos do biodiesel de pinhão manso por CG-EM

O método para determinação dos ésteres metílicos do biodiesel por CG-EM foi devidamente validado de acordo com o DOQ-CGCRE-008 (2011), para os ésteres metílicos C14:0 (miristato de metila), C16:0 (palmitato de metila), C16:1 (palmitoleato de Metila), C18:0 (estearato de metila), C18:1 (oleato de metila), C18:2 (linoleato de Metila) e C18:3 (linolenato de metila). A exatidão foi avaliada utilizando o MRC de biodiesel de soja do NIST/INMETRO (SRM 2772), através do Erro Normalizado (E_n) (Equação 5.2). Os valores certificados e experimentais para o MRC estão apresentados na Tabela 5.8.

$$E_n = \frac{X_{lab} - X_v}{\sqrt{U^2_{lab} + U^2_{ref}}}$$

Equação 5.2

Onde: X_{lab}: valor obtido experimentalmente; X_v: valor aceito como verdadeiro (valor certificado do MRC); U_{lab}: incerteza associada ao resultado experimental e U_{ref}: incerteza associada ao valor verdadeiro (incerteza declarada no certificado do MRC).

Os parâmetros avaliados na validação do método, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, limite de repetibilidade e precisão intermediária estão apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.8 Valores certificados e experimentais do MRC do biodiesel de soja do NIST.

MRC NIST (Valor Certificado)		MRC NIST (Valor Experimental)	
Média (g/kg)	**U (g/kg)**	**Média (g/kg)**	**U (g/kg)**
0,8	0,1	0,7	0,0
107,0	2,0	102,2	2,1
1,3	0,2	0,8	0,0
43,0	2,7	42,6	0,7
233,0	6,0	224,1	3,6
523,0	17,0	534,6	9,1
78,2	2,0	73,2	2,0

Tabela 5.9 Resultados dos parâmetros avaliados na validação do método para determinação dos ésteres metílicos por CG-EM.

Éster Metílico	Linearidade (R^2)	LD (g/kg)	LQ (g/kg)	Exatidão (%)	Repetibilidade (%)	Precisão Intermediária (%)
C14:0	0,9908	3,1	4,5	1,02	2,94	6,15
C16:0	0,9935	51,5	76,3	1,06	2,47	6,51
C16:1	0,9927	2,7	4,0	1,09	2,38	6,23
C18:0	0,9935	51,3	76,0	0,15	2,27	7,33
C18:1	0,9937	71,0	105,3	1,27	2,35	7,53
C18:2	0,9935	72,3	107,2	0,6	2,38	7,37
C18:3	0,9934	72,8	107,8	1,77	2,44	7,15

Os resultados dos parâmetros avaliados na validação do método para a determinação dos ésteres metílicos por CG-EM demonstram que o método é adequado para as análises dos ésteres metílicos com a qualidade exigida para esta determinação.

Na Figura 5.3 tem-se o perfil cromatográfico de uma amostra de biodiesel de pinhão manso obtido por CG-EM. Os resultados do teor de ésteres metílicos (%) para cada biodiesel estão apresentados na Tabela 5.10.

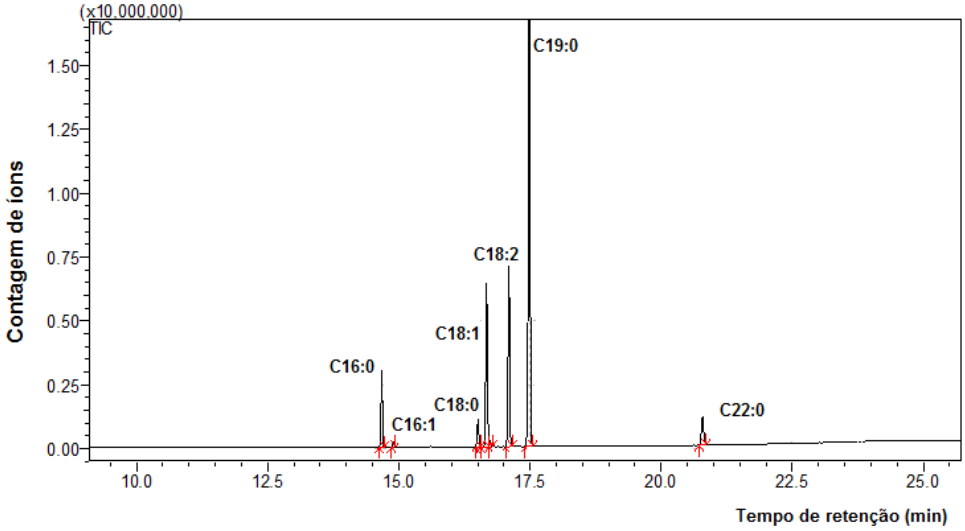

Figura 5.3 Perfil cromatográfico de uma amostra de biodiesel de pinhão manso obtido por CG-EM.

Tabela 5.10 Resultados do teor de ésteres metílicos totais (%) para cada biodiesel.

Biodiesel	Teor de Ésteres Metílicos Totais (%)	Desvio Padrão (%)
Bio 136	96,44	0,28
Bio 813	103,03	0,23
Bio 299	95,25	0,54
Bio 112	98,35	0,28
Bio 201	96,71	0,40
Bio 264	96,80	0,53
Bio 100	97,77	0,41
Bio 101	96,71	0,23
Bio 102	95,02	0,48

A qualidade do biodiesel está diretamente ligada ao seu teor de ésteres. A norma europeia EN14214 e a brasileira (ANP) definem a quantidade mínima de ésteres em 96,5 % (m/m). Conforme apresentado na Tabela 5.10, os resultados do teor de ésteres metílicos de cada biodiesel (todos acima de 95 %) produzido a partir do óleo de pinhão manso indicam uma boa conversão do óleo vegetal a ésteres metílicos para todas as amostras e indicam também um biodiesel de boa qualidade.

Os ésteres metílicos do biodiesel de pinhão manso foram quantificados, utilizando o C19:0 (nonadecanoato de metila) como padrão interno. O teor de ésteres foi obtido através da comparação da razão de áreas do éster e do padrão interno, admitindo-se o mesmo fator resposta. Os resultados do teor de cada éster (C16:0, C16:1, C18:0, *cis*-C18:1, *trans*-C18:1 e C18:2) em % estão apresentados na Tabela 5.11 e graficamente na Figura 5.4.

Tabela 5.11 Teor dos ésteres metílicos (%) nas amostras de biodiesel de pinhão manso.

	(%) Teor de éster								
Éster	**Amostras**								
	Bio 136	**Bio 813**	**Bio 299**	**Bio 112**	**Bio 201**	**Bio 264**	**Bio 100**	**Bio 101**	**Bio 102**
C16:0	15,06	15,37	14,39	15,10	14,06	14,82	13,94	13,48	14,09
C16:1	0,93	1,05	0,77	0,99	0,85	0,85	0,78	0,70	0,76
C18:0	5,94	5,75	5,51	5,52	6,20	5,59	7,36	6,70	6,55
***cis*-C18:1**	36,19	37,78	35,49	35,60	38,14	37,36	45,05	40,72	40,13
***trans*-C18:1**	1,29	1,38	1,09	1,33	1,32	1,24	0,97	1,09	1,13
C18:2	40,59	38,66	42,75	41,45	39,43	40,15	31,91	37,32	37,33

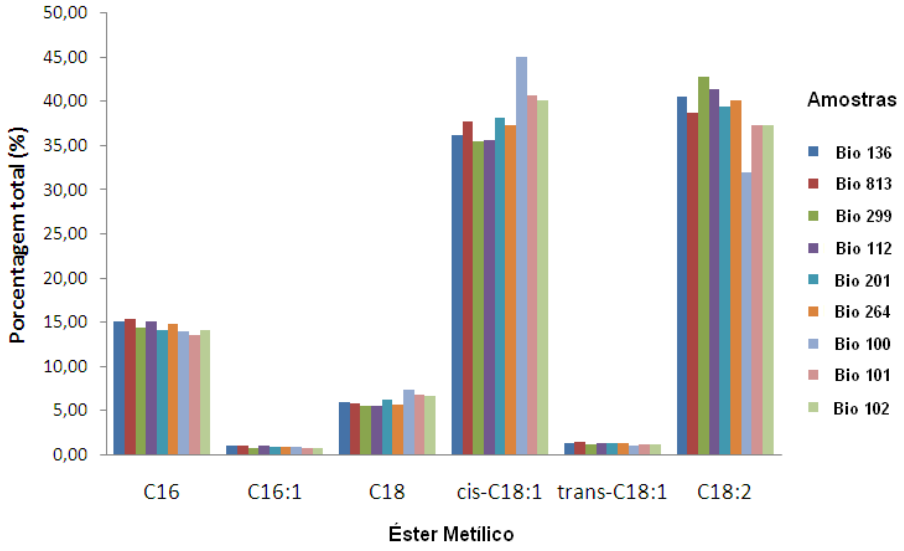

Figura 5.4 Teor de cada éster (%) presente nas amostras de biodiesel de pinhão manso.

Conforme a Figura 5.4, a relação do teor de éster (%) dos constituintes das amostras de biodiesel de pinhão manso não apresenta diferenças significativas entre elas. Todas as amostras apresentaram os mesmos ácidos graxos em suas composições, diferenciando apenas nas intensidades relativas e tendo o *cis*-C18:1 e o C18:2 como constituintes majoritários, da mesma forma que o óleo de pinhão

manso com composição predominantemente oleica (C18:1) e linoleica (C18:2) (FOIDL *et al*, 1996).

Dentre as propriedades do biodiesel que são determinadas pela composição dos ésteres de ácidos graxos tem-se a estabilidade oxidativa e a viscosidade (KNOTHE, 2005). A predominância do *cis*-C18:1 e do C18:2 nas amostras de biodiesel de pinhão manso, devido as insaturações, favorece algumas das propriedades físicas do biodiesel, tais como o ponto de entupimento e a viscosidade. As insaturações reduzem a viscosidade do biodiesel e melhoram as propriedades de ponto de entupimento. Entretanto, a presença de ácidos graxos insaturados irá causar baixa estabilidade oxidativa ao biocombustível.

5.6.4 Avaliação da assinatura isotópica do óleo de pinhão manso de diferentes origens geográficas por AE-EMRI.

O sistema AE-EMRI foi calibrado utilizando-se o material de referência internacional NBS-22 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 30,031 ± 0,043 ‰). Os dados foram gerados em triplicata (condições de repetibilidade) e normalizados pelo fator de correção de 1,00185, mesmo obtendo o valor de $\delta^{13}C_{VPDB}$ medido para o padrão de referência NBS-22 dentro da faixa do valor certificado. Na Tabela 5.12 são apresentados os valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos na calibração do sistema AE-EMRI.

Tabela 5.12 Verificação da calibração do sistema AE-EMRI.

MRC NBS22	$\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰)
Análise 1	-29,91
Análise 2	-30,04
Análise 3	-29,98
Média Experimental (‰)	-29,97
Desvio Padrão (‰)	0,07
Coeficiente de Variação (%)	0,22
Valor Certificado (‰) [IAEA, 1995]	-30,03
Desvio Padrão (‰) [IAEA, 1995]	0,06
Fator de correção (*single-point*)	1,00185

Para averiguar possíveis variações nos valores isotópicos em virtude do processo de extração, foram analisados os óleos de três diferentes extrações de cada semente de pinhão manso e cada uma em triplicata.

Os resultados dos valores isotópicos para a amostra 813 de óleo de pinhão manso e suas respectivas triplicatas são apresentados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 Resultados dos valores isotópicos de $\delta^{13}C$ de óleos de pinhão manso provenientes de três diferentes extrações da mesma semente (amostra 813).

Extração	Óleo de pinhão manso	$\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰)	Média (‰)	Desvio Padrão (‰)	C.V. (%)	Média das extrações (‰)	Desvio Padrão (‰)	C.V. (%)
1	813_1_1	-28,67	-28,69	0,03	0,09	-28,70	0,03	0,09
	813_1_2	-28,68						
	813_1_3	-28,72						
2	813_2_1	-28,62	-28,68	0,06	0,21			
	813_2_2	-28,74						
	813_2_3	-28,69						
3	813_3_1	-28,74	-28,73	0,02	0,07			
	813_3_2	-28,74						
	813_3_3	-28,71						

C.V. = Coeficiente de Variação.

Como o desvio padrão dos valores de $\delta^{13}C$ dos óleos das três diferentes extrações foi menor ou igual ao desvio padrão das próprias replicatas de análise e as médias obtidas para cada óleo muito semelhantes entre si, pode-se afirmar que o processo de extração do óleo não tem influência sobre a assinatura isotópica.

Desta forma, as amostras de óleo extraídas com o mesmo processo de extração foram comparadas entre si com relação aos seus valores de $\delta^{13}C$. Os valores isotópicos de $\delta^{13}C$ das amostras de óleo de pinhão manso de cada óleo estão apresentados na Tabela 5.14 e na Figura 5.5.

Tabela 5.14 Valores isotópicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ para amostras do óleo de pinhão manso de diferentes origens.

Amostra	Média $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰)	Média normalizada $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰)	Desvio Padrão (‰)	C.V. (%)
813	-28,65	-28,70	0,03	0,09
100	-28,45	-28,50	0,05	0,18
101	-29,85	-29,90	0,09	0,31
102	-28,52	-28,57	0,07	0,24
201	-29,00	-29,05	0,02	0,08
136	-29,27	-29,32	0,02	0,08
112	-28,84	-28,89	0,01	0,03
299	-28,93	-28,98	0,02	0,08
264	-28,77	-28,82	0,11	0,37

C.V. = Coeficiente de Variação.

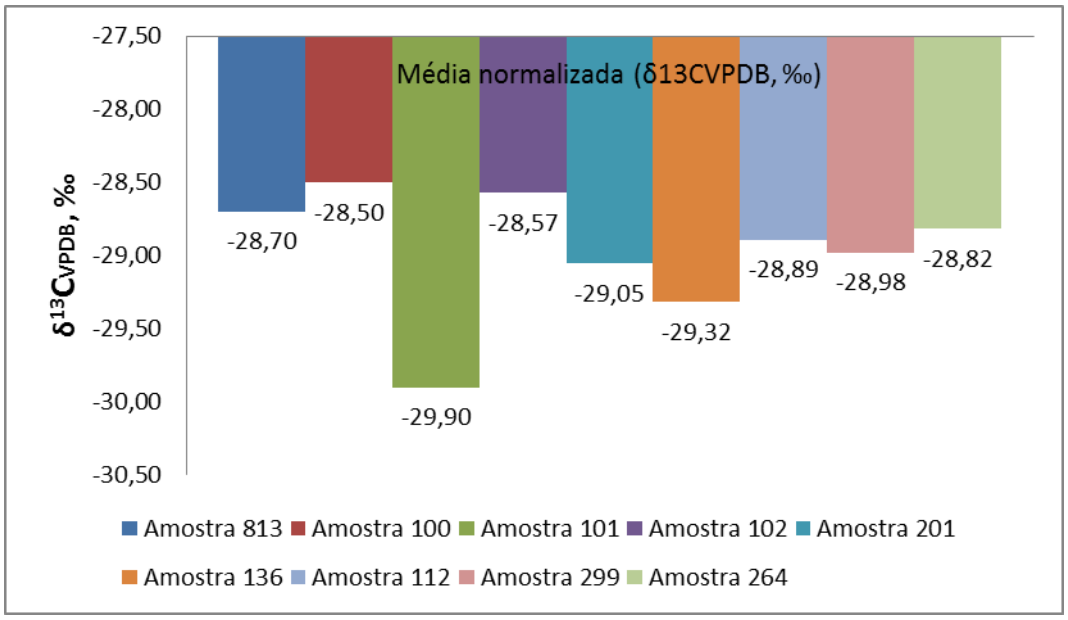

Figura 5.5 Valores isotópicos das amostras do óleo de pinhão manso de diferentes regiões.

Pela análise do gráfico da Figura 5.5, observa-se que não há diferença significativa nos valores isotópicos das amostras de óleo de pinhão manso. O valor isotópico $\delta^{13}C_{VPDB}$ para o óleo de pinhão manso por AE-EMRI foi determinado pela média dos valores isotópicos de todas as amostras e o desvio padrão das análises ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -28,9 ± 0,4). Os valores isotópicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) encontrados na literatura (KELLY; RHODES, 2002) para alguns óleos de diferentes origens obtidos por AE-EMRI e o valor isotópico de $\delta^{13}C_{VPDB}$ determinado nesse trabalho para o óleo de pinhão manso estão apresentados na Tabela 5.15.

Tabela 5.15 $\delta^{13}C_{VPDB}$ para os óleos de diferentes origens obtidos por AE-EMRI.

Óleos	$\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰)
Canola	-30,4 ± 1,6
Palma	-29,6 ± 1,2
Soja	-31,5 ± 1,3
Amendoim	-29,3 ± 0,9
Milho	-16,1 ± 1,0
Oliva	-29,9 ± 1,2
Pinhão manso*	-28,9 ± 0,4

n = 9 para o pinhão manso e n=3 para os demais óleos.
PANETTA; JAHREN, 2011.

Os valores isotópicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos para os óleos de pinhão manso de diferentes regiões estão na faixa dos valores isotópicos das oleaginosas com via biossintética C3, ou seja, estão de acordo com os dados disponíveis na literatura para os valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C_{VPDB}$) de óleos vegetais (KELLY; RHODES, 2002).

5.6.5 Avaliação da assinatura isotópica dos ésteres metílicos do biodiesel de pinhão manso de diferentes origens geográficas por CG-C-EMRI

Meier-Augenstein (2002) relatou a dificuldade da análise isotópica de ésteres metílicos em virtude da separação cromatográfica dos ésteres metílicos *cis* e *trans*. Para a análise isotópica é imprescindível uma boa resolução cromatográfica para que não haja variação isotópica nos resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰). Para tanto foi utilizada uma coluna capilar com a fase estacionária (50 % cianopropril, 50 % dimetilolisiloxano) que permitiu boa resolução dos picos dos ésteres metílicos e a separação dos isômeros *cis*-C18:1 e *trans*-C18:1.

Nas análises do biodiesel obtido a partir da transesterificação do óleo de pinhão manso por CG-C-EMRI, inicialmente foram injetadas uma mistura de padrões contendo o padrão de éster metílico C18:0 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 23,24 ± 0,01 ‰) da Universidade de Indiana (Bloomington, EUA) e o C22:0 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 27,09 ± 0,06 ‰) entre as análises para verificações das medições e o MRC de biodiesel de soja SRM 2772 do NIST/INMETRO. Os cromatogramas: (a) mistura C18:0 + C22:0 (*spiking*); (b) MRC de biodiesel de soja SRM 2772 NIST/INMETRO; (c) Biodiesel de pinhão manso + C19:0 + C22:0 são apresentados na Figura 5.6.

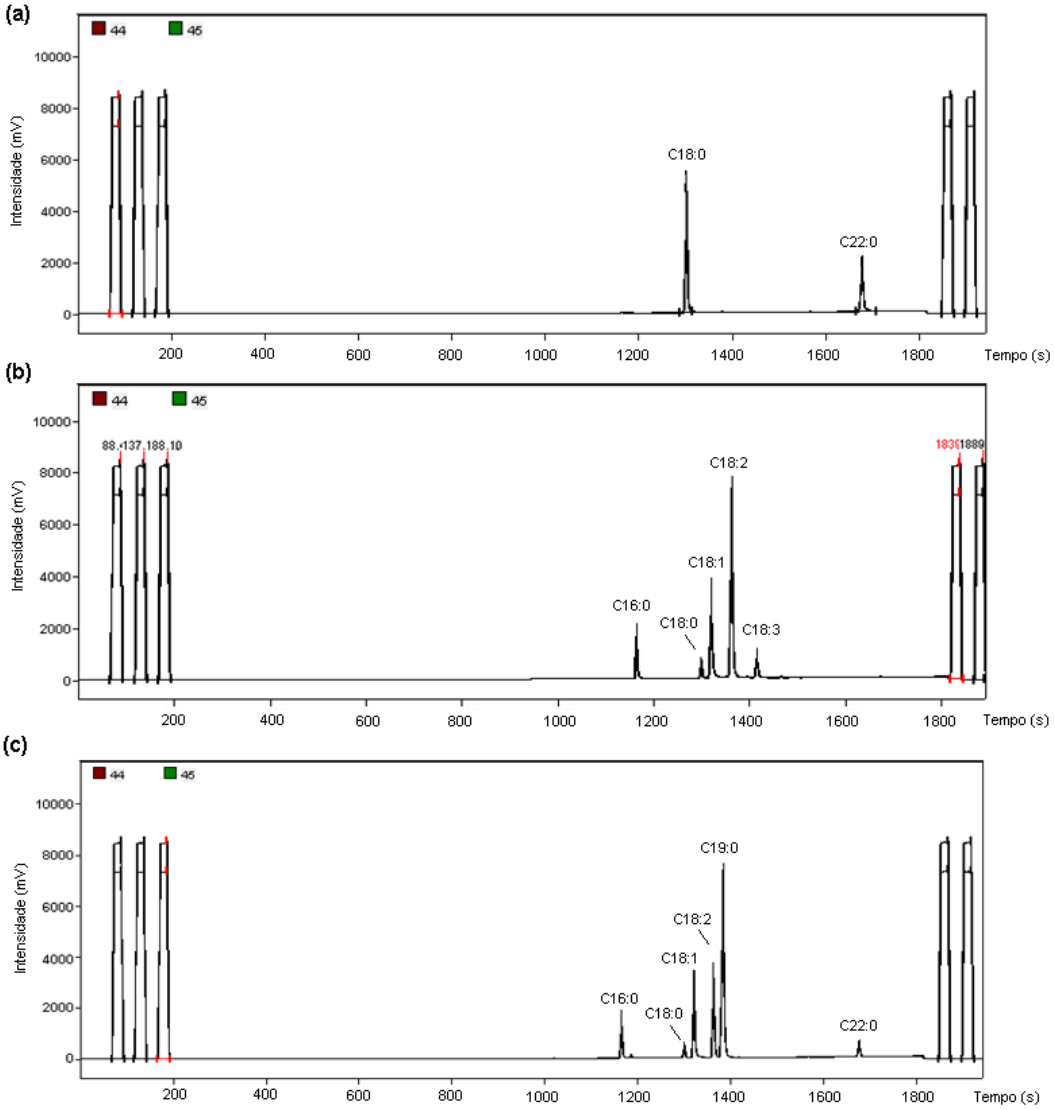

Figura 5.6 Cromatogramas obtidos por CG-C-EMRI (a) mistura dos padrões C18:0 (certificado) + C22:0 (*spiking*); (b) MRC de biodiesel de soja SRM 2772 NIST/INMETRO; (c) Biodiesel de pinhão manso + C19:0 + C22:0

Os valores isotópicos $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos por CG-C-EMRI do padrão isotópico certificado C18:0 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -23,24 ± 0,01 ‰) e do padrão C22:0 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = -27,09 ± 0,5) estão apresentados na Tabela 5.16 e no gráfico da Figura 5.7 os valores isotópicos $\delta^{13}C_{VPDB}$ do padrão isotópico certificado C18:0 e do padrão C22:0 obtidos por CG-C-EMRI e seus respectivos valores certificados e de referência de cada uma deles.

Tabela 5.16 Valores isotópicos dos padrões C18:0 e C22:0 determinados por CG-C-EMRI.

Análises	Padrão C18:0 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 23,24 ± 0,01 ‰)[a]	Padrão C22:0 ($\delta^{13}C_{VPDB}$ = - 27,09 ± 0,5 ‰)[b]
1	-23,30	-26,57
2	-22,99	-27,78
3	-23,21	-27,54
4	-22,76	-26,75
5	-23,05	-26,27
6	-23,18	-26,00
7	-23,04	-26,03
8	-22,85	-26,26
9	-22,77	-30,17
10	-22,68	-28,83
11	-22,65	-27,43
Média	**-22,95**	**-27,24**

[a] valor isotópico certificado; [b]valor isotópico de referência.

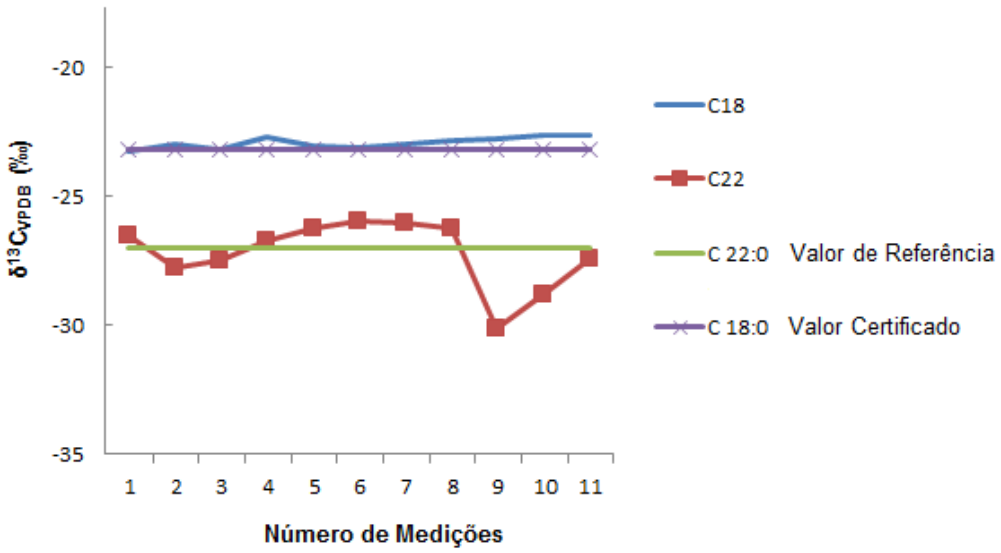

Figura 5.7 Valores isotópicos $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos por CG-C-EMRI do padrão isotópico certificado C18:0 e do padrão C22:0 e os respectivos valores certificados e de referência.

No gráfico da Figura 5.7 observa-se que os valores isotópicos obtidos para o padrão de C18:0 estão na faixa do valor certificado. Em relação ao padrão C22:0, houve uma pequena variação nas últimas análises que pode ter sido ocasionado pela combustão incompleta da amostra. Dependendo do número de determinações, é necessário fazer uma oxidação no reator do forno de combustão. Com esses resultados podemos afirmar que o sistema CG-C-EMRI está calibrado para as análises do biodiesel de pinhão manso.

Com relação ao C19:0, avaliando-se os valores isotópicos em cada amostra, observa-se que o desvio padrão dos valores brutos é menor que os valores após a normalização, o que mostra que o processo de obtenção dos biodieseis é a maior fonte de fracionamento isotópico, e consequente variação dos valores isotópicos, do que a análise em si, já que o C19:0 não participou do meio reacional. O desvio padrão do C19:0 nas amostras foi de 0,5 ‰, conforme critério adotado, nos dados brutos do valor isotópico, de acordo com a Tabela 5.17.

Tabela 5.17 Valores isotópicos brutos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) do C19:0 nas amostras de biodiesel de pinhão manso e os valores normalizados com o C22:0 (*spiking*).

$\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) C19:0		
Amostra	**Valor bruto**	**Valor Normalizado com C22:0**
813	-29,83	-31,98
136	-29,79	-30,56
112	-29,92	-31,59
100	-30,26	-32,54
201	-30,26	-32,89
101	-30,37	-34,37
102	-30,50	-32,54
264	-31,38	-31,90
299	-31,15	-32,13
Média	-30,38	-32,28
Desvio Padrão (DP)	0,6	1,0
C.V. (%)	1,8	3,2

C.V. = Coeficiente de variação.

Os resultados brutos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ dos ésteres metílicos do biodiesel de pinhão manso foram normalizados utilizando o método de normalização *single-point*, utilizando o padrão de referência secundário C22:0.

Os valores isotópicos brutos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ dos ésteres metílicos de cada amostra de biodiesel de pinhão manso estão apresentados na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 Valores isotópicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ dos ésteres metílicos (C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2) de cada amostra de biodiesel de pinhão manso.

	Éster Metílico (‰)			
Amostras	**C16:0**	**C18:0**	**C18:1**	**C18:2**
813	-31,99	-32,31	-30,67	-32,00
136	-31,48	-31,70	-29,93	-31,94
112	-31,51	-31,82	-29,93	-34,82
100	-31,84	-31,85	-29,72	-34,84
201	-32,50	-32,29	-30,45	-35,34
101	-34,68	-34,80	-32,54	-37,00
102	-31,52	-31,39	-29,38	-33,63
264	-30,48	-31,48	-28,38	-34,02
299	-30,88	-31,48	-29,36	-34,91
Média	-31,88	-32,12	-30,04	-34,28
Desvio Padrão	1,2	1,1	1,1	1,6
C.V.	-3,79	-3,29	-3,83	-4,69

Os valores de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos para os ésteres metílicos do biodiesel de pinhão manso apresentaram valores na faixa dos valores isotópicos característicos de planta com metabolismo C3. Os dados de valores isotópicos $\delta^{13}C_{VPDB}$ de ésteres metílicos de diferentes fontes disponíveis na literatura (PANETTA; JAHREN, 2011) estão apresentados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19 Valores isotópicos $\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) de ésteres metílicos de diferentes fontes e os valores obtidos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ dos ésteres metílicos do biodiesel de pinhão manso.

Ésteres Metílicos	$\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰)						
	Canola	**Palma**	**Soja**	**Amendoim**	**Milho**	**Oliva**	**Pinhão manso**
C16:0	−30,36	−29,72	−31,65	−29,63	−16,45	−30,01	-31,88
C18:0	-	−30,39	−32,79	−30,69	−16,00	−31,45	-32,12
C18:1	−29,89	−29,20	−31,02	−28,79	−16,01	−29,52	-30,04
C18:2	−30,56	−29,92	−31,50	−29,47	−16,10	−31,30	-34,28
Desvio Padrão (‰)	1,6	1,2	1,3	0,9	1,0	1,2	1,7

PANETTA; JAHREN, 2011.

Na Figura 5.8 pode-se observar o mesmo comportamento apresentado para os óleos de pinhão manso em relação à variação na proporção da matéria-prima e concentração de ésteres saturados e insaturados.

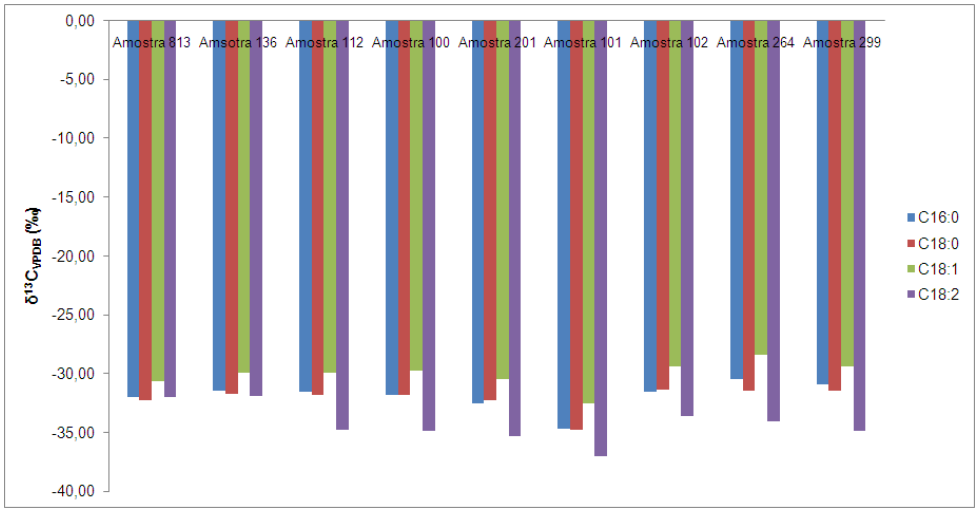

Figura 5.8 Valores isotópicos de $\delta^{13}C_{VPDB}$ dos ésteres metílicos (C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2) de cada amostra de biodiesel de pinhão manso.

Ao analisar os resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ obtidos para os ésteres metílicos do biodiesel de pinhão manso observam-se as mesmas características das amostras de óleo de pinhão manso, ou seja, o valor isotópico mais negativo para o C18:1 e para o C18:2 em todas as amostras de biodiesel de pinhão manso.

5.7 Conclusões

A avaliação do perfil isotópico de $\delta^{13}C_{VPDB}$ do óleo de pinhão manso e dos ésteres metílicos do biodiesel a partir da transesterificação do óleo de pinhão manso foi possível mediante as análises de amostras de semente e do óleo de pinhão manso de diferentes origens geográficas. Com a determinação da razão isotópica da matéria-prima e do biodiesel foi possível traçar um perfil isotópico esperado para o biodiesel, que se torna uma ferramenta que permite caracterizar e atestar qualidade ao mesmo.

O método para determinação da razão isotópica de $\delta^{13}C_{VPDB}$ demonstrou a importância do uso de materiais de referência para garantir a confiabilidade das medições isotópicas. Foi identificada a ocorrência de fracionamento isotópico no processo de transesterificação do óleo e o uso de um padrão como *spiking* foi crucial

para que os possíveis fracionamentos isotópicos fossem identificados ao longo do processo e corrigidos através dos métodos de normalização.

As características das matérias-primas utilizadas na produção do biodiesel combinadas com a determinação da razão isotópica através da técnica de espectrometria de massas de razão isotópica são capazes de caracterizar e correlacionar às mesmas tornando-se então uma ferramenta na caracterização do biodiesel garantindo rastreabilidade e confiabilidade ao produto final.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES FINAIS

6.1 Conclusões Gerais

A importância dos métodos de calibração e normalização nas medições isotópicas foi evidenciada nos estudos e a sua aplicação não abrange somente as análises isotópicas de etanol combustível e biodiesel, mas sim as medições isotópicas em geral. Nos métodos de calibração e de normalização se faz necessário o uso de materiais de referência adequados, além disso, para garantir confianças às medições isotópicas, os valores isotópicos brutos devem ser normalizados utilizando pelo menos um método de normalização. Destacou-se também a importância da produção de materiais de referência certificados para as análises isotópicas por CG-C-EMRI.

Com um método seletivo e rastreável ao VPDB, foi possível avaliar a assinatura isotópica do etanol combustível de diferentes fontes de matéria-prima e origens geográficas e com a análise estatística dos resultados foi possível traçar o perfil isotópico do etanol combustível de cana-de açúcar no Brasil.

Na avaliação do perfil isotópico do biodiesel de pinhão manso, o uso de um padrão *spiking* foi crucial na identificação de fracionamento isotópico no processo de transesterificação do óleo de pinhão manso para a obtenção do biodiesel.

Com a diversidade de matérias-primas com potencial para a produção do biodiesel, a avaliação do perfil isotópico da matéria-prima, o óleo de pinhão manso, e do biodiesel de pinhão manso é uma forma de atestar qualidade ao produto final.

Através da técnica de EMRI foi possível traçar o perfil isotópico dos biocombustíveis: etanol combustível e biodiesel, sendo uma ferramenta que permite garantir a rastreabilidade e confiabilidade aos mesmos.

6.2 Perspectivas Futuras

Como perspectivas futuras tem-se como desafio a produção de material de referência certificado para valores isotópicos, a princípio para matrizes simples, como o etanol combustível e posteriormente para matrizes complexas como o biodiesel.

A participação em comparações internacionais e atuação como provedores em ensaios de proficiência para medições isotópicas também são consideradas metas futuras.

REFERÊNCIAS

AGUILAR-CISNEROS, B. O. et al. Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of $^{13}C/^{12}C$ and $^{18}O/^{16}O$ ratios of ethanol. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7520-7523, 2002.

AGUILERA, R.; HATTON, C. K.; CATLIN, D. H. Detection of epitestosterone doping by isotope ratio mass spectrometry. **Clinical Chemistry,** v. 48, n. 4, p. 629-636, 2002.

AI, G.; SUN, T.; DONG, X. Gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry: Analysis of methanol, ethanol and acetic acid by direct injection of aqueous alcoholic and acetic acid samples. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** v. 28, p. 1674-1682, 2014.

ALONSO-SALCES, R. M. et al. Virgin olive oil authentication by multivariate analyses of 1HNMR fingerprints and $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ data. **Journal Agricultural and Food Chemistry,** v. 58, p. 5586–5596, 2010.

ANGEROSA, F. et al. Carbon stable isotopes and olive oil adulteration with pomace oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 45, p. 3044-3048, 1997.

ANGEROSA, F. et al. Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1013-1017, 1999.

AVINASH, A.; SUBRAMANIAM, D.; MURUGESAN, A. Bio-diesel - A global scenario. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 29, p. 517–527, 2014.

BAUME, N. et al. Use of isotope ratio mass spectrometry to detect doping with oral testosterone undecanoate: Inter-individual variability of $^{13}C/^{12}C$ ratio. **Steroids,** v. 71, p. 364-370, 2006.

BENSON S. et al. Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry – A Review. **Science International,** v. 157, p. 1-22, 2006.

BENSON, S. J. et al. Analysis of explosives using isotope ratio mass spectrometry (IRMS) - Preliminary study on TATP and PETN. **Science & Justice,** v. 49, p. 81-86, 2009.

Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para desenvolvimento sustentável. Organização BNDES e CGEE – Rio de Janeiro: BNDES, 2008. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/livro_brasil_em_transicao/Brasil_em_transicao_cap21.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2014.

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

BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of natural materials: II. Atmospheric, terrestrial, marine, and freshwater environments. In: COLEMAN, D. C.; FRY, B. (Ed.). **Carbon Isotope Techniques.** New York: Academic Press, 1991, v. 11, p.171-185.

BRASIL. Lei nº 11.097, de janeiro 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. **Subchefia para Assuntos Jurídicos da Casa Civil da Presidência da República,** Brasília, DF, 13 jan. 2005. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/lei11097_13jan2005.pdf> Acesso em: jan. 2012.

BRAND, W. A., et al. Assessment of international reference materials for isotope-ratio analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry,** v. 86, p. 425-467, 2014.

BREÁS, O.; RENIERO, F.; SERRINI, G. Isotope Ratio Mass Spectrometry: Analysis of Wines from Different European Countries. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** v. 8, p. 967-970, 1994.

BRICHE, C. S. et al. High accuracy isotope dilution analysis for the determination of ethanol using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. **Analyst,** v. 125, p. 2189-2195, 2000.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. Fat and oil derivatives. Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl esters contents. In: **EN14103:2011.** European Committee for Standardization: Brussels, 2011.

BROGIO, J. R. **Barreiras Internacionais ao Etanol Combustível**. 2009. 176 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/EQ), Rio de Janeiro, 2009.

CABAÑERO, A. I.; RECIO, J. L; RUPÉREZ, M. Isotope ratio mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography for wine ethanol characterization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** v. 22, p. 3111-3118, 2008.

CASTANHEIRA, E. G. et al. Environmental sustainability of biodiesel in Brazil. **Energy Policy,** v. 65, p. 680-691, 2014.

CAWLEY, A. T.; FLENKER, U. The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. Journal of Mass Spectrometry, v.43, p. 854-864, 2008.

CAWLEY, A. T. et al. Carbon isotope ratio ($\delta^{13}C$) values of urinary steroids for doping control in sport. **Steroids,** v. 74, p. 379-392, 2009.

CHUM, H. L. et al. A comparison of commercial ethanol production systems from Brazilian sugarcane and US corn**. Biofuels, Bioproducts and Biorefining,** v. 8, p. 205-223, 2014.

COPLEN, T. B. et al. New Guidelines for $\delta^{13}C$ Measurements. **Analytical Chemistry,** v. 78, p. 2439-2441, 2006.

CRAIG, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 12, p. 133-149, 1957.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L. et al. Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences (Review). **Journal of Chromatography A,** v. 1158, p. 33-46, 2007.

DAVISON, A. C.; HINKLEY D. V. Bootstrap methods and their application. In: **Cambridge Series in Statistical and Probabilistic Mathematics.** Cambridge University Press, 1997, 594 p.

De BIÈVRE, P. Reference materials by isotope ratio mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews,** v. 12, p. 143-172, 1993.

De BIÈVRE, P. Looking for the ‘appropriate’ Certified Reference Material (CRM). **Accreditation and Quality Assurance**, v.10, p. 519–520, 2006.

De BIÈVRE, P. On the difference between a ‘reference material’ and a ‘material reference’. **Accreditation and Quality Assurance,** v. 16, p. 391-392, 2011.

De BIÈVRE J. R, De LAETER, P.; PEISER, H. S. Isotope mass spectrometry in metrology**. Mass Spectrometry Reviews,** v. 11, p. 193-245, 1992.

DELAIGLE, A.; MEISTER, A. Density estimation with heteroscedastic error. **Bernoulli,** v. 14, p. 562–579, 2008.

DOANE, D. P.; SEWARD, L. E. Measuring Skewness: A Forgotten Statistic? **Journal of Statistics Education,** v. 19, n.2, p. 1-28, 2011.

DUEWER, D. L. An approach to the metrologically sound traceable assessment of the chemical purity of organic reference materials. In: **National Institute of Standards and Technology Special Publication 1012** (NIST SP). Gaithersburg, 2004. 53 p.

ECOÓLEO. **Pinhão manso: Jatropha Curcas.** 2011. Disponível em: <www.pinhãomanso.com.br> Acesso 18 dez, 2014.

EDER, K. Gas chromatography analysis of fatty acid methyl esters. **Journal of chromatography B,** v. 671, p. 113-131, 1995.

EFRON, B.; TIBSHIRANI, R. J. An Introduction to the Bootstrap. In: **Monographs on *Statistics* and Applied Probability.** London: Chapman & Hall/CRC, 1993, 11 p.

FAN, J. On the optimal rates of convergence for nonparametric deconvolution problems. **The Annals of Statistics,** v. 19, p. 1257–1272, 1991.

FARQUHAR, G. D.; EHLERINGER, J. R.; HUBICK, K. T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** v. 40, p. 503-537, 1989.

FIORAVANTE, A. L. et al. Developments of Environmental Certified Reference Material from the Brazilian Metrology Institute to Support National Traceability. **International Journal of Measurement Technologies and Instrumentation Engineering,** v. 3, p. 1-17, 2013.

FREITAS, J. G. et al. Methane Production and Isotopic Fingerprinting in Ethanol Fuel Contaminated Sites. **GroundWat**er, v. 48, p. 844-857, 2010.

FREITAS, L. C.; KANEKO, S. Ethanol demand in Brazil: Regional approach. **Energy Policy,** v. 39, p. 2289-2298, 2011.

FRIEDMAN, M.; The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. Journal of the American Statistical Association 32 (200): 675–701, 1937.

GERHARD, K. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress in Energy and Combustion Science,** v. 36, p. 364-373, 2010.

GIEBEL, B. M.; SWART, P. K; RIEMER, D. D. $\delta^{13}C$ stable isotope analysis of atmospheric oxygenated volatile organic compounds by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. **Analytical Chemistry,** v, 82, p. 6797-6806, 2010.

GIEBEL, B. M.; SWART, P. K.; RIEMER, D. D. New Insights to the Use of Ethanol in Automotive Fuels: A Stable Isotopic Tracer for Fossil- and Bio-Fuel Combustion Inputs to the Atmosphere. **Environmental Science & Technology,** v. 45, p. 6661-6669, 2011.

GIMÉNEZ-MIRALES, J. E.; SALAZAR, D. M.; SOLANA, I. Regional origin assignment of red wines from Valencia (Spain) by 2H NMR and 13C IRMS stable isotope analysis of fermentative ethanol. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2645-2652, 1999.

GODIN, J. P.; McCULLAGH, J. S. Review: Current applications and challenges for liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry (LC/IRMS). **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** v. 25, p. 3019-3028, 2011.

GOROG, S. The sacred cow: the questionable role of assay methods in characterizing the quality of bulk pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 36, p. 931-937, 2005.

GUILLOU, C. et al. Determination of the ^{13}C contents of organic acids and sugars in fruit juices: an inter-comparison study. **Analytica Chimica Acta**, v. 388, p.137-143, 1999.

HO, D. P.; NGO, H.; GUO, W. A mini review on renewable sources for biofuel. **Bioresource Technology,** v. 169, p. 742-749, 2014.

HRASTAR, R. et al. Fatty acid and stable carbon isotope characterization of camelina sativa oil: implications for authentication. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 57, p. 579-585, 2009.

INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENTS (IRMM). **Reference Materials.** Certificate of Analysis, Standard Reference Material. Disponível em: <http://www.irmm.jrc.be> Acesso em: 09 mar. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (Inmetro). DOQ-CGCRE-008, **Orientações sobre validação de métodos de ensaio químicos**, Revisão 4, Duque de Caxias, RJ, 2011b

_____. **Material de Referência Certificado.** Duque de Caxias, Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <htpp://www.inmetro.gov.br/metcientifica/mrc.asp>. Acesso em: 20 ago. 2014.

_____.**O que é o Inmetro.** Duque de Caxias, Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <htpp://www.inmetro.gov.br/ inmetro/oque.asp>. Acesso em: 04 fev. 2015.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). **Reference and intercomparison materials for stable isotopes of light elements**. Vienna, Austria, 1995, ISSN 1011-4289, 159 p.

_____. **NBS 22, Oil.** Materials with known ^{2}H, ^{13}C,^{15}N and ^{18}O isotopic composition. In: Reference products for environment and trade. Vienna, Austria, 2009. Disponível em: <http://nucleus.iaea.org/rpst/ReferenceProducts/ReferenceMaterials/Stable_Isotopes/2H13C15Nand18O/NBS_22.htm>. Acesso em: 20 ago. 2014.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). **Água – Projeto Hydros X,** 2014. Disponível em: <http://www.iea.org/newsroomandevents/pressreleases/2014/august/name-125080-en.html>. Acesso em: 11 mar. 2014**.**

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 35:2006 Certification of reference material** - General and Statistical Principles. Genebra: ISO, 2006, 64 p.

ISHIDA-FUJII, K. Botanical and geographical origin identification of industrial ethanol by stable isotope analyses of C, H and O. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, p. 2193-2199, 2005.

ISHIKAWA, K., et al. Mass balance method for purity assay of phthalic acid esters: development of primary reference materials as traceability sources in the Japan Calibration Service System. **Accreditation and Quality Assurance,** v. 16, p. 311-322, 2011.

JCGM 100:2008 - Evaluation of measurement data – **Guide of the expression of uncertainty in measurement** (GUM). In: Joint Committee for Guides in Metrology, 2008. 134 p.

JOANES, D. N.; GILL, C. A. Comparing measures of sample skewness and kurtosis. **The Statistician,** v. 47, p. 183-189, 1998.

KELLY, S. et al. Assessing the authenticity of single seed vegetable oils using fatty acid stable carbon isotope ratios ($^{13}C/^{12}C$). **Food Chemistry,** v. 59: p. 181-186, 1997.

KELLY, S. D.; RHODES, C. Emerging techniques in vegetable oil analysis using stable isotope ratio mass spectrometry. **Grasas y Aceites,** v. 53, n. 1, p. 34-44, 2002.

KING, B.; WESTWOOD, S. GC–FID as a primary method for establishing the purity of organic CRMs used for drugs in sport analysis. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry,** v. 370, p. 194-199, 2001.

KIPPHARDT, H.et al. "Calibration" in isotopic measurements. **International Journal of Mass Spectrometry,** v. 198, p. 71-76, 2000.

KLEIN, P. D.; KLEIN, E. R. Stable Isotopes in Biomedical Research. **Spectra,** v. 8, p. 9-12, 1982.

KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J. **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. 340p.

KOH, M. Y.; GHAZI, T. I. M. A review of biodiesel production from *Jatropha curcas L.* oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 15, p. 2240-2251, 2011.

KUBÁSEK, J.; URBAN, O.; SANTRUCEK, J. C4 plants use fluctuating light less efficiently than do C3 plants: a study of growth, photosynthesis and carbon isotope discrimination. **Physiologia Plantarum,** v. 149, p. 528-539, 2013.

KUMAR, S.; SINGH, N.; PRASAD, R. Anhydrous ethanol: A renewable source of energy**. Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 14, p. 1830-1844, 2010.

KUTNER, M., Nachtsheim, C. Neter, J., and LI., W. Applied Linear Statistical Models, 5 edition, Irwin, U.S.A., 1996.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: Olkin, I. et al (Eds.). **Contributions to Probability and Statistics:** Essays in Honor of Harold Hotteling. California: Stanford University Press, p. 278-292, 1960.

LI, KE; ZHANG, LIN; ZHAO GUOXING. Study of normalization method of isotopic compositions to isotope reference scales. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research,** v. 6, p. 1-5, 2014.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova,** v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology,** v. 70, p. 1-15, 1999.

MARTINS *et al*; O BIODIESEL DE SEBO BOVINO NO BRASIL. Renata Martins, Kátia Nachiluk, Carlos Roberto Ferreira Bueno, Silene Maria de Freitas. Informações Econômicas, SP, v. 41, n. 5, maio 2011.

MATTHEWS, D. E.; HAYES, J. M. Isotope-ratio monitoring gas chromatography mass spectrometry. **Analytical Chemistry,** v. 50, p. 1465-1473, 1978.

McGILL, R.; TUKEY, J. W.; LARSEN, W. A. Variations of Box Plots. **The American Statistician**, v. 32, n. 1, p. 12-16, 1978.

MEIER-AUGENSTEIN, W. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry**. Journal of Chromatography,** v. 842, p. 351-371, 1999.

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatography analysis*.* **Analytical Chemistry,** v. 33, p. 363-364, 1961.

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry,** v. 38, p. 514-515, 1966.

METCALFE, L. D.; WANG, C. N. Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base-catalysed transesterification. **Journal of Chromatography Science,** v. 19, p. 530-535, 1981.

MORETTO, E.; FETT, R. **Óleos e gorduras vegetais: processamento e análises**. Florianópolis: UFSC, Segunda edição, 179 p, 1986.

MUNTON, E. et al. Systematic comparison of $\delta^{13}C$ measurements of testosterone and derivative steroids in a freeze-dried urine candidate reference material for sports drug testing by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry and uncertainty evaluation using four different metrological approaches. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, p. 1641-165, 2011.

MUNTON, E. et al. Certification of steroid carbon isotope ratios in a freeze-dried human urine reference material. **Drug Testing and Analysis,** v. 4, p. 928-933, 2012.

NEVES, L. A. et al. The carbon isotopic ($^{12}C/^{13}C$) signature of sugarcane bioethanol: certifying the major source of renewable fuel from Brazil. **Analytical Methods,** v. *7*, p. 4780-4785, 2015.

NEVES, L. A. et al. The influence of different referencing methods on the accuracy of $\delta^{13}C$ value measurement of ethanol fuel by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry (GC/C/IRMS)". **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** 2015. Aceito em: jul. 2015.

PADOVAN, G.J. et al. Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}C/^{12}C$ isotopic ratio. **Food Chemistry**, v. 82, p. 633-636, 2003.

PANETTA, R. J.; JAHREN, A. H. Single-step transesterification with simultaneous concentration and stable isotope analysis of fatty acid metyl esters by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry,** v. 25, p. 1373-1381, 2011.

PAUL, D.; SKRZYPEK, G.; FÓRIZS, I. Normalization of measured stable isotopic compositions to isotope reference scales – a review. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** v. 21, p. 3006–3014, 2007.

PEARSON, K. Editorial no to inequalities for moments of frequency functions and for various statistical constants. **Biometrika,** v. 21, n. 1-4, p. 361-375,1929.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. In: R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2014, 3604 p.

ROSENBLATT, M. Remarks on some nonparametric estimates of a density function. **Annals of Mathematical Statistics,** v. 27, p. 832–837, 1956.

ROSSMANN, A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. **Food Reviews International**, v.17, p. 347-381, 2001.

ROYER, A. et al. Stable isotope characterization of olive oils. I - Compositional and carbon-13 profiles of fatty acids**. Journal of the American Oil Chemists' Society, v.** 76, p. 357-363, 1999.

SANO, M. A. et al. New technique for the detection of metabolites labeled by isotope ^{13}C using mass fragmentography. **Biomedical Mass Spectrometry,** v. 3, p. 1-3, 1976.

SCHIMMELMANN, A. **Hydrogen, carbon, nitrogen, and oxygen stable isotope reference materials and Indiana zinc from Indiana University.** Disponível em: <http://mypage.iu.edu/~aschimme/files/list%20of%20n-alkanes.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2014.

SCHIPILLITI, L. et al. Authenticity control on lemon essential oil employing gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (CG-C-IRMS). **Food Chemistry,** v. 131, p. 1523-1530, 2012.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a Review. **Journal Brazilian Chemical Society,** v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.

SERRA, F. et al. Inter-laboratory comparison of elemental analysis and gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry (CG-C-IRMS). Part I: $\delta^{13}C$ measurements of selected compounds for the development of an isotopic Grob-test. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 361-369. 2007.

SESSIONS, A. L. Isotope-ratio detection for gas chromatography – Review. **Journal of Separation Science,** v. 29, p. 1946-1961, 2006.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of *Jatropha* Oil. **Energy Fuels,** v. 18, p. 154-159, 2004.

SHAHID, E. M.; JAMAL, Y. Production of biodiesel: A technical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 15, p. 4732-4745, 2011.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika,** v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.

SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. **Fuel**, v. 87, p. 2355-2373, 2008.

SHARP, Z. **Principles of Stable Isotope Geochemistry.** New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2007.

SILVERMAN, B. W. Density Estimation for Statistics and Data Analysis. In: **Monographs on *Statistics* and Applied Probability.** London: Chapman & Hall/CRC, 1998, 175 p.

SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 14, p. 200–216, 2010.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental.** 6. ed. São Paulo: Bookman, 2009.1056 p.

SMALLWOOD, B. J.; PHILP, R. P.; ALLEN, J. D. Stable carbon isotopic composition of gasolines determined by isotope ratio monitoring gas chromatography mass spectrometry. **Organic Geochemistry,** v. 33, p. 149-159, 2002.

SPANGENBERG, J. E.; MACKO, S. A.; HUNZIKER, J. Characterization of olive oil by carbon isotope analysis of individual fatty acids: implications for authentication. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4179-4184, 1998.

SPANGENBERG, J. E.; OGRINC, N. Authentication of vegetable oils by bulk and molecular carbon isotope analysis with emphasis on olive oil and pumpkin seed oil. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1534-1540, 2001.

SPANGENBERG, J. E.; DIONISI, F. Characterization of cocoa butter and cocoa butter equivalents by bulk and molecular carbon isotope analysis: implications for vegetable fat quantification in chocolate. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4271-4277, 2001.

SPITZKE M. E.; FAUHL-HASSEK, C. Determination of the $^{13}C/^{12}C$ ratios of ethanol and higher alcohols in wine by GC-C-IRMS analysis. **European Food Research and Technology**, v. 231, p. 247-257, 2010.

SRIVASTAVA, A.; PRASSAD, R. Triglycerides-based diesel fuel. **Renewable & Sustainable Energy Reviews,** v.4, p. 111-113, 2000.

SUGARCANE**. Producing Food and Fuel.** In: Sustainability. Disponível em: <http://sugarcane.org/sustainability/producing-food-and-fuel>. Acesso em: 15 dez. 2014.

TAPANES, N. C. O. et al. Transesterification of Jatropha curcas oil glycerides: theoretical and experimental studies of biodiesel reaction. **Fuel,** v. 87, p. 2286-2295, 2008.

TAYLOR, J. K. **"Handbook for SRM Users"** - National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA, 1993.

TRIANA, C. A. R. Energetics of Brazilian ethanol: Comparison between assessment approaches. **Energy Policy,** v. 39, p. 4605-4613, 2011.

TYLER, B. C. Guidelines and recommended terms for expression of stable isotope ratio and gas-ratio measurement results. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** v. 25, p. 2538-2560, 2011.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (UNICA). **Guia do Etanol.** Disponível em: <http://www.unicadata.com.br/>. Acesso em: 12 out. 2014.

_____. **A Sustentabilidade no Setor Sucroenergético Brasileiro.** Disponível em: <http://www.unica.com.br/sustentabilidade/>. Acesso em: 15 dez. 2014.

van LEEUWEN, K. A. et al. Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry for traceability and authenticity in food and beverages. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,** v. 13, p. 814-837, 2014.

VETTER, W.; GAUL, S.; MELCHER, J. Improved quality control in gas chromatography interfaced to stable isotope ratio mass spectrometry by application of derivative chromatography. **Analytica Chimica Acta,** v. 590, p. 49–54, 2007.

Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia - VIM. Portaria Inmetro 029 de 1995, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, 2012.

VOGL J. Advances in isotope ratio mass spectrometry and required isotope reference materials. **Mass Spectrometry**, v. 2, p. 1-7, 2013.

von ECKSTAEDT, C. V. et al. δD and $\delta^{13}C$ analyses of atmospheric volatile organic compounds by thermal desorption gas chromatography isotope ratio mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1218, p. 6511-6517, 2011.

WILK, M. B.; GNANADESIKAN, R. Probability plotting methods for the analysis for the analysis of data. **Biometrika,** v. 55, p. 1-17, 1968.

WOODBURY, S. E. et al. Detection of vegetable oil adulteration using gas chromatography combustion/isotope mass spectrometry. **Analytical Chemistry,** v. 67, p. 2685-2690, 1995.

WOODBURY, S. E.; EVERSHED, R. P.; ROSSELL, J. B. $\delta^{13}C$ analyses of vegetable oil fatty acid components, determined by gas chromatography – combustion-isotope mass spectrometry, after saponification or regiospecific hydrolysis. **Journal of Chromatography A,** v. 805, p. 249-257, 1998.

YIU-CHUNG YIP; SIU-KAY WONG; SIK-MAN CHOI. Assessment of the chemical and enantiomeric purity of organic reference materials. **TrAC Trends in Analytical Chemistry,** v. 30, p. 628-640, 2011.

ZELAND, M.; JACKSON, G. P. Isotope ratio mass spectrometry. Minireview. **Analyst,** v. 134, p. 213-222, 2009.

ZYAKUN, A. M. et al. The use of $^{13}C/^{12}C$ isotope abundance ratio for characterization of the origin of ethyl alcohol. **Applied Biochemistry and Microbiology,** v. 36, n. 1, p. 11-14, 2000.