



EVA LÚCIA CARDOSO SILVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS PROPOSTAS PARA ANÁLISE DE
BIODIESEL E ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE PONTO DE FULGOR E O TEOR
DE ÁLCOOL RESIDUAL**

CAMPINAS, 2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

EVA LÚCIA CARDOSO SILVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS PROPOSTAS PARA ANÁLISE DE
BIODIESEL E ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE PONTO DE FULGOR E O TEOR
DE ÁLCOOL RESIDUAL**

ORIENTADOR: PROF. DR. MATTHIEU TUBINO

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR EVA LÚCIA CARDOSO SILVEIRA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MATTHIEU TUBINO.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

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

Si39d Silveira, Eva Lúcia Cardoso (1981-).
Desenvolvimento de novas propostas para análise de biodiesel e estudo da relação entre ponto de fulgor e o teor de álcool residual / Eva Lúcia Cardoso Silveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Matthieu Tubino.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Biodiesel. 2. Ponto de fulgor. 3. Espectrofotometria. 4. Anions. 5. Cromatografia de íons. I. Tubino, Matthieu. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Development of new proposals for biodiesel analysis and study of t relationship between flash point and concentration of residual alcohol

Palavras-chave em inglês:

Biodiesel

Flash point

Spectrophotometry

Anions

Ion chromatography

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Matthieu Tubino [Orientador]

Eny Maria Vieira

Tereza Cristina Rodrigues Elsholz

Adriana Vitorino Rossi

Maria Izabel Maretti Silveira Bueno

Data de defesa: 10/08/2012

Programa de pós-graduação: Química

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, meu irmão, meu pai e em especial a minha mãe Helena, pela dedicação, apoio e incentivo sempre. Aos meus avós Dulce e Raimundinho, pelos ensinamentos e exemplo de vida, que mesmo distantes conseguiram me dar forças para concluir mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS

- A Deus.
- Ao Prof. Dr. Tubino, pela orientação, ensinamentos, dedicação e paciência.
- Ao CNPq pela bolsa concedida.
- A minha amiga Lilia Basílio de Caland, pela amizade construída ainda durante a iniciação científica, e pela convivência agradável durante o doutorado, assim como também pelas contribuições para a realização deste trabalho e ao seu esposo Euzébio Guimarães pela amizade, convivência e por ajudar a solucionar os problemas com o meu notebook.
- A Flamys Lena e Aline Guadalupe pela amizade e apoio principalmente durante a etapa final deste trabalho.
- Aos amigos piauienses, que contribuíram para amenizar a saudade da minha terra querida; aos amigos paquistaneses e as amigas do laboratório GIA, Juliana Cortez, Klécia, Laiane e Lívia pelos momentos de diversão.
- Aos professores Dra. Adriana Vitorino Rossi, Dr. Nivaldo Baccan e Dr. João Carlos de Andrade pelas sugestões durante o exame de qualificação.
- A equipe de especialistas da Metrohm pela assistência, sempre que necessário.
- A todos os integrantes e ex-integrantes do grupo de pesquisa em Química Analítica e Educação (GPQUAE) pela troca de experiências e pelos momentos de descontração.
- A Acácia, técnica do GPQUAE por estar sempre disposta a ajudar no que for necessário.
- Aos alunos de Iniciação Científica Jorge Boog, Tiago Elias e Mariana Vila.
- Ao prof. Dr. Fábio Augusto e a Gabriela Salazar pelas análises de biodiesel realizadas no Laboratório de Cromatografia Gasosa do IQ/UNICAMP.
- A profa. Dra. Carol Collins pela revisão do inglês do abstract desta tese, assim como dos artigos científicos.
- A Rita Souza, técnica do Laboratório de Espectrometria de Massas pela realização das análises por ESI-MS.

CURRICULUM VITAE

Eva Lúcia Cardoso Silveira

Formação Acadêmica/Titulação

2007 - 2012

Doutorado em Ciências

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

2005 - 2007

Mestrado em Química

Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

Título: Análise qualitativa e quantitativa de óleo lubrificante novo e usado

Orientador: Edmilson Miranda de Moura

1999 - 2005

Graduação em Licenciatura Plena em Química

Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

1999 - 2002

Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas

Universidade Estadual do Piauí, UESPI, Teresina, Brasil

Artigos completos publicados em periódicos

Caland, L.B.; Silveira, E.L.C.; Tubino, M. Determination of sodium, potassium, calcium and magnesium cations in biodiesel by ion chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 718, 116.

Silveira, E.L.C.; Caland, L.B.; Tubino, M. Molecular absorption spectrophotometric method for the determination of phosphorus in biodiesel. *Fuel* **2011**, 90, 3485.

Boog, J.H.F.; Silveira, E. L.C; Caland, L.B.; Tubino, M. Determining the residual alcohol in biodiesel through its flash point. *Fuel* **2011**, 90, 905.

Silveira, E.L.C.; Coelho, R. C.; Moita Neto, J.M.; Moura, C.V.R.; Moura, E.M. Determinação de metais em óleos lubrificantes, provenientes de motores de ônibus urbano, utilizando a FAAS. *Química Nova* **2010**, 33, 1863.

Silveira, E.L.C.; Caland, L.B.; Moura, C.V.R.; Moura, E.M. Determinação de contaminantes em óleos lubrificantes usados e em esgotos contaminados por esses lubrificantes. *Química Nova* **2006**, 29, 1193.

Apresentação de trabalhos em congressos internacionais

Silveira, E.L.C.; Caland, L.B.; Tubino, M. Determination of Na, K, Mg and Ca in biodiesel using ion chromatography. In: 6 th Conference on Ion Analysis, **2011**, Berlin, Germany.

Silveira, E.L.C.; Caland, L.B.; Tubino, M. Alternative Method for Determination of Alcohol in Biodiesel. In: 3rd EuCheMS Chemistry Congress, **2010**, Nurnberg, Germany.

Caland, L.B., Silveira, E.L.C.; Tubino, M. Alternative methods for determination of metals in biodiesel samples. In: 3rd EuCheMS Chemistry Congress, **2010**, Nurnberg, Germany.

Silveira, E.L.C.; Caland, L.B.; Tubino, M. Determination of Phosphorus in Biodiesel by Spectrophotometry In: 3rd EuCheMS Chemistry Congress, **2010**, Nurnberg, Germany.

Silveira, E.L.C.; Caland, L.B.; Boog, J.H.F.; Tubino, M. Determination of residual alcohol in biodiesel samples. In: 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition. Rimini, Italy. *Journal of Biotechnology* **2010**, 150, 192.

Silveira, E.L.C.; Caland, L.B.; Tubino, M. Development of a Simple method for the determination of phosphorus in biodiesel. In: 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition. Rimini, Italy. *Journal of Biotechnology* **2010**, 150, 164.

Caland, L.B., Silveira, E.L.C., Tubino, M. Vegetable oils and animal fat biodiesel: Analysis of metal ions. In: 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition. Rimini, Italy. *Journal of Biotechnology* **2010**, 150, 193.

Exercício de Magistério Superior

2° semestre de 2005: Universidade Estadual do Piauí, Campus de Piri-piri

Disciplinas: Química Analítica Qualitativa - 60 h

Metodologia do Ensino de Ciências – 60 h

1° Semestre de 2006: Universidade Estadual do Piauí, Campus de Amarante

Disciplina: Química Orgânica II – 60 h

2° Semestre de 2006: Universidade Estadual do Piauí, Campus de Água Branca

Disciplina: Química Instrumental – 90 h

1° Semestre de 2007: Universidade Estadual do Piauí, Campus de Esperantina

Disciplina: Pesquisa e Prática Educativa I – 60 h.

2° Semestre de 2009: Universidade Estadual de Campinas – Programa de Estágio
a Docência (PED C)

Disciplina: Química Analítica IV (QA 416-D) – 90 h

Exercício de Magistério na Educação Básica

03/1999 - 12/2001 Colégio Estadual D. Rosaura Muniz Barreto, São Miguel do Tapuio - Piauí.

Aulas de Química – 1ª a 3ª Série do Ensino Médio.

03/2002 - 12/2003 Unidade Escolar Profª Maria de Lourdes Rebelo, Teresina-PI.

Aulas de Química - 1ª a 3ª Série do Ensino Médio.

08/2006 - 07/2007 Unidade Escolar Benjamin Baptista, Teresina-Piauí

Aulas de Química - 1ª a 3ª Série do Ensino Médio.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS PROPOSTAS PARA ANÁLISE DE BIODIESEL E ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE PONTO DE FULGOR E O TEOR DE ÁLCOOL RESIDUAL. Um método de baixo custo é proposto neste trabalho para a análise quantitativa do álcool residual em biodiesel através da determinação do ponto de fulgor. Foram analisados ésteres metílicos obtidos de óleos de soja, milho, girassol e de sebo bovino. Os ésteres etílicos foram obtidos de óleo de soja. Em todos os casos ficou evidente que há uma correlação entre o ponto de fulgor e o teor de álcool residual no biodiesel. Assim, o parâmetro ponto de fulgor pode ser usado diretamente para determinar o teor de álcool residual do biodiesel. Foi proposto também um método para a determinação de fósforo em biodiesel por espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis. As amostras de biodiesel são mineralizadas por calcinação a 550 °C seguindo dissolução do resíduo em H_2SO_4 1,0 mol L^{-1} . O procedimento analítico é baseado na formação do complexo azul de molibdênio. Empregou-se o ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico como agente redutor. O método foi aplicado para amostras de biodiesel de soja, canola, girassol e de sebo bovino. Os limites de detecção e quantificação obtidos para fósforo foram de 0,57 mg kg^{-1} e 1,71 mg kg^{-1} , respectivamente. O desvio padrão relativo médio obtido foi cerca de 5 %. A simplicidade do procedimento adicionado à precisão, exatidão e o baixo custo indicam que é uma excelente opção para a determinação de fósforo em biodiesel. Um terceiro método, neste caso, para a determinação de ânions em biodiesel baseado na extração com água assistida por ultrassom também foi desenvolvido neste trabalho. Os extratos obtidos das amostras de biodiesel foram analisados por cromatografia de íons. Os limites de quantificação foram 0,97; 4,10; 0,30; 2,47 e 0,26 mg kg^{-1} para acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato, respectivamente. A técnica de cromatografia de íons mostrou-se viável para a separação e quantificação de ânions orgânicos e inorgânicos em biodiesel simultaneamente diminuindo assim o tempo de análise.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NEW PROPOSALS FOR BIODIESEL ANALYSIS AND THE STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN FLASH POINT AND CONCENTRATION OF RESIDUAL ALCOHOL.

A low cost method is proposed in this work for the quantitative analysis of residual alcohol in biodiesel through determination of the flash point. We analyzed methyl esters obtained from oils such as soy, corn, sunflower and of bovine fat. The ethyl esters were obtained from soy oil. In all cases it became very evident that there is a correlation between the flash point and the residual alcohol content in the biodiesel. Therefore the parameter flash point can be used to directly determine the residual alcohol content of biodiesel. A method has been proposed for the determination of phosphorus in biodiesel by UV-vis molecular absorption spectrophotometry. The biodiesel samples are mineralized using an ashing procedure at 550 °C following dissolution of the residue in 1.0 mol L⁻¹ H₂SO₄. The analytical procedure is based on the formation of a blue molybdenum complex. 1-amino-2naphthol-4-sulfonic acid is used as reducing agent. The method was applied to biodiesel samples of soy, canola and sunflower oils and of bovine fat. The limits of detection and quantification are 0.57 mg kg⁻¹ and 1.71 mg kg⁻¹, respectively. The average standard deviation obtained was about 5 %. The simplicity of the procedure added to its precision, accuracy and low cost indicate that it is an excellent option for the determination of phosphorus in biodiesel. A third method, in this case, for the determination of anions in biodiesel based on extraction with ultrasound assisted water has also been developed in this study. The extracts of biodiesel samples were analyzed by ion chromatography. The limits of quantification obtained were 0.97, 4.10, 0.30, 2.47 and 0.26 mg kg⁻¹ for acetate, formate, chloride, phosphate and sulfate, respectively. The technique of ion chromatography proved to be feasible for the simultaneously separation and quantification of organic anions in biodiesel, thereby reducing analysis time.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
LISTA DE TABELAS	xxv
LISTA DE FIGURAS	xxvii
PREFÁCIO	xxxi
<i>Capítulo 1: Biodiesel</i>	1
1- BODIESEL.....	3
1.1-Definição.....	3
1.2. Vantagens do biodiesel frente ao diesel mineral	4
1.3. Características dos óleos vegetais	6
1.4. Produção de biodiesel	10
1.4.1. Reação de transesterificação.....	10
1.5. Parâmetros de qualidade.....	12
1.5.1. Viscosidade cinemática	19
1.5.2. Número de cetano	19
1.5.3. Estabilidade à oxidação a 110 °C.....	20
1.5.4. Índice de iodo.....	21
1.5.5. Teor de água.....	21
1.5.6. Índice de acidez.....	22
1.5.7. Glicerina livre e total	23
1.5.8. Teor de éster.....	24
<i>Capítulo 2: Estudo da relação entre ponto de fulgor e o teor de álcool residual ...</i>	27
1. OBJETIVOS.....	29
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1. Definição.....	29
2.2. Álcool residual.....	31
2.3. Métodos analíticos para a determinação de álcool residual	31
3. PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1. Reagentes e Soluções.....	35
3.2. Procedimento Experimental.....	35

3.2.1. Síntese do biodiesel.....	35
3.2.2. <i>Procedimentos para avaliação do teor de álcool residual</i>	36
3.2.2.1. Preparo de amostras	36
3.2.2.2. Medidas do ponto de fulgor	36
3.2.2.3. Cromatografia a gás	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÕES PARCIAIS	45
<i>Capítulo 3: Determinação de fósforo em biodiesel por espectrofotometria de absorção molecular</i>	47
1. OBJETIVO	49
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	49
2.1. <i>Contaminantes inorgânicos em biodiesel</i>	49
2.2. <i>Métodos analíticos para a determinação de fósforo e outros elementos em biodiesel</i>	51
2.2.1. Métodos oficiais para a determinação de fósforo	51
2.2.2. Técnicas espectrométricas empregadas para a determinação de fósforo em biodiesel.....	52
2.2.3. Técnicas de separação analítica.....	56
2.2.4. Técnicas eletroanalíticas	58
2.3. <i>Métodos espectrofotométricos baseados na formação de complexo azul de molibdênio</i>	59
2.3.1. Determinação de fósforo em óleos vegetais por espectrofotometria	60
2.3.2. Determinação de fósforo em biodiesel por espectrofotometria.....	61
3. PARTE EXPERIMENTAL	63
3.1. <i>Equipamentos utilizados</i>	63
3.2. <i>Reagentes e soluções</i>	63
3.3. <i>Procedimento Experimental</i>	64
3.3.1. Preparo das soluções empregadas na reação de formação do complexo azul de molibdênio.....	64
3.3.2. Determinação do teor de fósforo no padrão de lecitina de soja	65
3.3.3. Determinação do teor de fósforo em amostras de biodiesel.....	66

3.3.4. Determinação de fósforo no padrão lecitina de soja purex por cromatografia de íons	66
4. <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	69
4.1. <i>Determinação do teor de fósforo no padrão lecitina de soja</i>	69
4.1.1. Comparação dos resultados obtidos por espectrofotometria e por cromatografia de íons.	70
4.2. <i>Validação do método para análise de biodiesel</i>	74
4.2.1. Linearidade	74
4.2.2. Limites de detecção e de quantificação	76
4.2.3. Precisão	76
4.2.4. Exatidão	77
4.3. Aperfeiçoamento do procedimento de calcinação da amostra	78
4.4. Análise de amostras de biodiesel	79
5. <i>CONCLUSÕES PARCIAIS</i>	83
<i>Capítulo 4: Determinação de ânions orgânicos e inorgânicos em biodiesel por cromatografia de íons</i>	85
1. OBJETIVO	87
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	87
2.1. <i>Início do uso da cromatografia de íons</i>	87
2.2. <i>Fundamentos da cromatografia de íons</i>	88
2.2.1. Técnica de supressão em cromatografia de íons	91
2.3. <i>Procedimentos de preparo de amostras para análise por cromatografia de íons</i>	94
2.3.1. Extração líquido-líquido	94
2.3.2. Irradiação com ultravioleta.....	96
2.3.2.1. Fontes de radiação ultravioleta.....	96
2.3.2.2. Aplicações da foto-oxidação UV no pré-tratamento de amostras	97
3. PARTE EXPERIMENTAL	101
3.1. <i>Equipamentos utilizados</i>	101
3.2. <i>Reagentes, soluções e amostras</i>	102
3.3. Limpeza das vidrarias	103

<i>3.4. Procedimento Experimental</i>	103
<i>3.4.1. Preparo das soluções de referência para construção das curvas analíticas</i>	103
<i>3.4.2. Determinação de fósforo em biodiesel</i>	104
3.4.2.1. Aplicação do preparo de amostra empregado para o método espectrofotométrico	104
3.4.2.1.1. Teste com acetato de bário para eliminar o sulfato na forma de BaSO ₄ e adição de HNO ₃ para eliminar o íon acetato.....	105
3.4.2.2. Digestão por Irradiação ultravioleta (UV)	105
3.4.2.2.1. Digestão empregando o digestor UV Metrohm 705	106
3.4.2.2.1.1. Digestão direta da amostra com adição de H ₂ O ₂	106
3.4.2.2.1.2. Saponificação prévia da amostra.....	106
3.4.2.2.2. Irradiação UV com lâmpada de vapor de mercúrio.....	107
3.4.2.3. Digestão por ozonólise	107
3.4.2.3.1. Digestão por ozonólise associada à irradiação UV.....	108
3.4.2.4. Digestão por radiação UV empregando tubos de quartzo	109
3.4.3. Determinação do teor de álcool em biodiesel por cromatografia a gás .	109
3.4.4. Determinação do teor de ésteres em biodiesel por cromatografia a gás	110
3.4.5. Determinação da estabilidade oxidativa de amostras de biodiesel.....	111
3.4.6. Análise de amostras de biodiesel por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)	111
3.4.7. Determinação de acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato em biodiesel por cromatografia de íons.....	112
3.4.7.1. Extração líquido-líquido assistida por ultrassom.....	112
3.4.7.1.1. Fortificação das amostras de biodiesel.....	112
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
<i>4.1. Determinação de fósforo por cromatografia de íons</i>	113
4.1.1. Aplicação do procedimento de preparo de amostra já empregado para o método espectrofotométrico desenvolvido no capítulo 3	113
4.1.2. Digestão por Irradiação Ultravioleta (UV)	114
4.1.2.1. Digestão empregando o digestor UV Metrohm 705	114

4.1.2.1.1. Digestão direta da amostra com adição de H ₂ O ₂	114
4.1.2.1.2. Saponificação	115
4.1.2.2. Irradiação com lâmpada de vapor de mercúrio.....	116
4.1.2.3. Digestão por ozonólise e radiação UV.....	118
4.2. <i>Avaliação da presença de ânions orgânicos em biodiesel</i>	124
4.2.1. <i>Análise em amostras de biodiesel por cromatografia a gás</i>	124
4.2.1.1. Determinação do teor de álcool residual.....	124
4.2.1.2. Determinação do teor de ésteres.....	125
4.2.2. Avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel	126
4.3. <i>Avaliação da formação do ácido glicerofosfórico após Irradiação UV</i>	134
4.3.1. Digestão por radiação UV empregando tubos de quartzo	134
4.3.2. Análises por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)	138
4.4. <i>Determinação de acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato em biodiesel por cromatografia de íons</i>	147
4.4.1. Validação do método	147
4.4.1.1. Linearidade	147
4.4.1.2. Limites de detecção e quantificação	150
4.4.1.3. Precisão	151
4.4.1.4. Exatidão	152
4.4.2. Análise de amostras de biodiesel	156
5. CONCLUSÕES PARCIAIS	159
CONSIDERAÇÕES FINAIS	161
PERSPECTIVAS	163
REFERÊNCIAS.....	165
ANEXOS	177

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS** - Espectrometria de Absorção Atômica
- ABNT** – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ANP** – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
- ASTM** – American Society for Testing and Materials
- CEN** – Comitté European de Normalization
- CI** – Cromatografia de íons
- ESI – MS** - Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (ESI-MS)
- ETAAS** - Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica
- FAES** - Espectrometria de Emissão Atômica em Chama
- FIA-SD** - Injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica
- FTIR** – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
- GFAAS** - Espectrometria de absorção atômica com atomização por forno de grafite
- GC-FID** – Cromatografia a gás com detector de ionização em chama
- HPLC** – Cromatografia Líquida de alta eficiência
- HR-CS AAS** - Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução
- HR-CS ETAAS** – Espectrometria de absorção atômica por atomização eletrotérmica com fonte contínua de alta resolução
- HR-CS GFAAS** - Espectrometria de absorção atômica por forno de grafite com fonte contínua de alta resolução
- HTGC** – Cromatografia a gás em altas temperaturas
- ICP-MS** - Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente
- ICP OES** - Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente
- ISO** – International Organization for Standardization
- MIR** - Espectroscopia no Infravermelho Médio
- NIR** – Espectroscopia na região do infravermelho próximo
- PNPB** – Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
- RMN¹H** – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SPME – Microextração em fase sólida

UV – Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. <i>Ácidos graxos comuns em óleos e gorduras.....</i>	8
Tabela 1.2. <i>Distribuição dos ácidos graxos para diferentes óleos e gorduras...</i>	9
Tabela 1.3. <i>Especificação do biodiesel pela ANP, resolução 14/2012.....</i>	14
Tabela 1.4. <i>Ponto de Entupimento de Filtro a Frio.....</i>	16
Tabela 2.1. <i>Teor de metanol em biodiesel metílico de milho e ponto de fulgor após adição de quantidades conhecidas de metanol. Para $\alpha = 0,05$, valor do t crítico = 4,30 (n=3).</i>	40
Tabela 2.2. <i>Ponto de fulgor para biodiesel de soja obtido por rota metílica e etílica após adição de quantidades conhecidas de metanol ou etanol. Os valores de ponto de fulgor são as médias de três determinações independentes.....</i>	41
Tabela 2.3. <i>Ponto de fulgor para amostra de biodiesel de girassol e sebo bovino após adição de quantidades conhecidas de metanol. Os valores de ponto de fulgor são as médias de três determinações independentes.....</i>	41
Tabela 3.1. <i>Comparação entre os valores obtidos por espectrofotometria e cromatografia de íons para o teor de fósforo em lecitina de soja usando teste-t de Student e o teste-F de Snedecor. Para $\alpha = 0,05$, valor do t crítico = 4,30 e o valor do F crítico = 19,00 (n=3).....</i>	73
Tabela 3.2. <i>Comparação entre os resultados obtidos e o valor de referência para o teor de fósforo em lecitina de soja comercial.....</i>	74
Tabela 3.3. <i>Recuperação do teor de fósforo adicionado às amostras de biodiesel na forma de lecitina de soja.....</i>	80
Tabela 4.1. <i>Eluentes usados para detecção por condutividade com supressão química da condutividade de fundo.....</i>	93
Tabela 4.2. <i>Parâmetros analíticos obtidos para a separação e determinação dos ânions acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato em biodiesel. Coluna analítica Metrosep A Supp 5 (4 x 150 mm). Eluente: Na_2CO_3 1,7 mmol L⁻¹ e NaHCO_3 0,5 mmol L⁻¹.</i>	120
Tabela 4.3. <i>Concentração (mg kg⁻¹) dos ânions em biodiesel analisados por cromatografia de íons.....</i>	121
Tabela 4.4. <i>Composição em porcentagem dos ésteres alquílicos em amostras de biodiesel.....</i>	125
Tabela 4.5. <i>Parâmetros analíticos obtidos para a separação e determinação dos ânions em biodiesel. Coluna analítica Metrosep A Supp 5 (4 x 250 mm). Eluente: Na_2CO_3 3,2 mmol L⁻¹ e NaHCO_3 1,0 mmol L⁻¹.....</i>	151
Tabela 4.6. <i>Repetibilidade do tempo de retenção e área do sinal analítico para os íons acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato.....</i>	152
Tabela 4.7. <i>Recuperação dos ânions acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato em biodiesel de soja por cromatografia de íons.....</i>	155
Tabela 4.8. <i>Concentração (mg kg⁻¹) dos ânions acetato, formiato, cloreto e sulfato em biodiesel analisados por cromatografia de íons.....</i>	157

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema do processo total de transesterificação.....	11
Figura 1.2. <i>Número de publicações sobre biodiesel no período de 1992 a 2012.</i>	17
Figura 1.3. <i>Evolução anual do número de publicações entre 1992 e 2011.</i>	18
Figura 2.1. Equipamento Pensky-Martens de vaso fechado.Marca Quimis.	37
Figura 2.2. <i>Dependência do ponto de fulgor do biodiesel no teor de álcool residual.</i>	43
Figura 3.1. Estrutura molecular da fosfatidilcolina (FC), R representa longa cadeia hidrocarbonada que pode conter insaturações.....	69
Figura 3.2. <i>Curva analítica obtida a partir de soluções padrão de fósforo em concentrações de 2,0 a 10,0 mg L⁻¹.</i>	70
Figura 3.3. Espectro de absorção molecular para o complexo azul de molibdênio obtido a partir de uma amostra de lecitina de soja.....	71
Figura 3.4. <i>Curva analítica obtida a partir de soluções-padrão de fosfato em concentrações de 2,0 a 30,0 mg L⁻¹.</i>	71
Figura 3.5. Cromatograma obtido para uma solução de lecitina de soja após digestão por radiação ultravioleta.....	72
Figura 3.6. Espectros de absorção molecular obtidos para padrões de fósforo em concentrações de 0,5 a 2,5 mg L ⁻¹	75
Figura 3.7. <i>Curva analítica obtida a partir dos espectros de absorção molecular de padrões de fósforo em concentrações variando de 0,5 a 2,5 mg L⁻¹.</i>	75
Figura 3.8. Espectro de absorção molecular para o complexo azul de molibdênio obtido a partir de uma amostra de biodiesel de sebo bovino.....	79
Figura 4.1. <i>Exemplo de fase estacionária empregada na separação de ânions.</i>	89
Figura 4.2. <i>Mecanismo de troca iônica para a determinação de ânions.</i>	90
Figura 4.3. <i>Diagrama esquemático da cromatografia de íons com detecção por condutividade com supressão.</i>	92
Figura 4.4. <i>Cromatógrafo de íons modelo 882 compact IC Metrohm.</i>	102
Figura 4.5. <i>Digestor UV 705 Metrohm.</i>	102
Figura 4.6. <i>Sistema empregado para a ozonização das amostras.</i>	108
Figura 4.7. <i>Sistema empregado para a ozonização das amostra e irradiação UV.</i>	108
Figura 4.8. <i>Sistema utilizado para irradiação UV com tubo de quartzo acoplado ao condensador.</i>	109
Figura 4.9. <i>Cromatograma obtido para uma solução contendo 20,0 mg L⁻¹ de fosfato: (A) adição de acetato de bário e (B) acetato de bário 1,0 mol L⁻¹ e HNO₃ 1,0 mol L⁻¹.</i>	114
Figura 4.10. <i>Cromatograma obtido para uma amostra de biodiesel de soja, objetivando a análise de fósforo.</i>	115
Figura 4.11. <i>Cromatograma obtido para uma amostra de biodiesel de soja após pré-tratamento por saponificação.</i>	116

Figura 4.12. Cromatograma obtido para amostra de biodiesel de soja, pré-tratamento por irradiação UV com lâmpada 100 W e adição de HNO_3	117
Figura 4.13. Cromatograma para biodiesel de soja, pré-tratamento por irradiação UV com lâmpada de mercúrio 500 W (A): sem HNO_3 ; (B) com adição de HNO_3 1,0 mol L^{-1}	117
Figura 4.14. Reações de decomposição do ozônio formando espécies radiculares (Golimowski e Golimowska, 1996).....	118
Figura 4.15. Cromatograma padrão 2,0 mg L^{-1} . Picos: (1) acetato; (2) formiato; (3) cloreto; (4) fosfato; (5) sulfato.....	119
Figura 4.16. Determinação de ânions em biodiesel de soja. Pré-tratamento somente extração em água. Picos: (1) acetato; (2) formiato; (3) cloreto; (4) sulfato.....	121
Figura 4.17. Cromatograma obtido para biodiesel de soja. A) após ozonólise. Picos: (1) acetato; (2) formiato; (3) cloreto; (4) sulfato. B) após ozonólise + radiação UV. Picos: (1) acetato; (2) formiato; (3) cloreto; (4) fosfato; (5) sulfato.....	122
Figura 4.18. Estrutura molecular do ácido glicerofosfórico.....	123
Figura 4.19. Teste da estabilidade oxidativa para biodiesel de soja.....	127
Figura 4.20. Teste da estabilidade oxidativa para biodiesel de canola.....	127
Figura 4.21. Teste da estabilidade oxidativa para biodiesel de óleo de soja bruto.....	128
Figura 4.22. Teste da estabilidade oxidativa para biodiesel de sebo bovino..	128
Figura 4.23. Mecanismo geral de oxidação de um ácido graxo.....	130
Figura 4.24. Formação dos compostos orgânicos de baixa massa molecular a partir da reação recorrente dos hidroperóxidos.....	132
Figura 4.25. Cromatograma obtido para uma amostra de lecitina de soja com concentração de 3,23 mg L^{-1} de fosfato.....	135
Figura 4.26. Cromatograma obtido para uma amostra de biodiesel de soja após irradiação UV.....	136
Figura 4.27. Cromatograma obtido para uma amostra de biodiesel de soja com adição de lecitina após irradiação UV- concentração de fosfato 0,972 mg L^{-1}	136
Figura 4.28. Cromatograma obtido para o éster linoleato de metila após irradiação UV – concentração de fosfato 4,33 mg L^{-1}	137
Figura 4.29. Esquema da interconversão do ácido glicerofosfórico.....	138
Figura 4.30. Reação de desidratação do ácido fodsfoglicérico produzindo ácido fosfoenolpirúvico.....	139
Figura 4.31. ESI (+) MS do branco (solução de peróxido de hidrogênio 30 %)......	140
Figura 4.32. ESI (+) MS da amostra de lecitina de soja.....	141
Figura 4.33. ESI (+) MS de biodiesel de soja, sem lecitina e sem irradiação UV.....	141
Figura 4.34. ESI (+) MS de biodiesel de soja, sem lecitina e com irradiação UV.....	142
Figura 4.35. ESI (+) MS de biodiesel de soja, com lecitina e irradiação UV.....	142

Figura 4.36. ESI (+) MS de éster linoleato de metila com lecitina e irradiação UV.....	143
Figura 4.37. Espectro ESI (+) MS obtido para amostras de biodiesel fortificadas com lecitina de soja. (a) 5,0 mg kg ⁻¹ de fósforo; (b) 10,0 mg kg ⁻¹ de fósforo; (c) 15,0 mg kg ⁻¹ de fósforo; (d) 20,0 mg kg ⁻¹ de fósforo e (e) 25,0 mg kg ⁻¹ de fósforo.....	144
Figura 4.38. Integração dos sinais obtidos por ESI (+) MS para amostras de biodiesel em diferentes concentrações de fósforo: (a) 5,0 mg kg ⁻¹ ; 10,0 mg kg ⁻¹ ; 15,0 mg kg ⁻¹ ; 20,0 mg kg ⁻¹ e 25,0 mg kg ⁻¹	145
Figura 4.39. Correlação entre a concentração de fósforo em biodiesel e a área do sinal ESI (+) MS do ácido glicerofosfórico.....	146
Figura 4.40. Cromatograma padrão. Picos: (1) acetato (2,0 mg L ⁻¹); (2) formiato (2,0 mg L ⁻¹); (3) cloreto (0,6 mg L ⁻¹); (4) fosfato (2,0 mg L ⁻¹); (5) sulfato (1,0 mg L ⁻¹).....	147
Figura 4.41. Curva analítica obtida para o íon acetato. Faixa de concentração: 1,0 a 5,0 mg L ⁻¹	148
Figura 4.42. Curva analítica obtida para o íon formiato. Faixa de concentração: 2,0 a 10,0 mg L ⁻¹	148
Figura 4.43. Curva analítica obtida para o íon cloreto. Faixa de concentração: 0,3 a 1,5 mg L ⁻¹	149
Figura 4.44. Curva analítica obtida para o íon fosfato. Faixa de concentração: 1,0 a 5,0 mg L ⁻¹	149
Figura 4.45. Curva analítica obtida para o íon sulfato. Faixa de concentração: 0,5 a 2,5 mg L ⁻¹	150
Figura 4.46. Cromatogramas relativo à recuperação dos íons acetato, formiato, cloreto, sulfato e fosfato em biodiesel de soja.....	154
Figura 4.47. Cromatogramas obtidos para os extratos das amostras de biodiesel analisadas por cromatografia de íons.....	156

PREFÁCIO

PREFÁCIO

Atualmente há uma grande procura por novas fontes de energia renovável e fontes livres de poluentes. Vários fatores motivam esta busca; entre eles a poluição atmosférica causada por derivados do petróleo, a ameaça de escassez e o aumento do preço do petróleo. O biodiesel é um combustível renovável que cada vez mais vem ganhando força no cenário nacional e internacional. O Brasil apresenta condições climáticas e de solo favoráveis, o que o torna competitivo no mercado como produtor de biocombustíveis, como biodiesel e bioetanol.

O biodiesel foi inserido na matriz energética brasileira através da Lei nº 11.097 publicada em 13 de janeiro de 2005, que especificava a adição de 5 % de biodiesel ao diesel de origem mineral até 2013. No entanto, desde janeiro de 2010 o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5 % de biodiesel.

Com a inserção do biodiesel na matriz energética brasileira intensificaram-se ainda mais as pesquisas, tanto objetivando novos processos para a obtenção de biodiesel, como no desenvolvimento de métodos para o controle de qualidade deste combustível. Na Europa, as especificações físico-químicas de qualidade para o biodiesel estão agrupadas na norma EN 14214; nos Estados Unidos pela norma ASTM 6751 D, enquanto no Brasil a regulamentação é feita pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) através da resolução 14/2012. Entre os parâmetros instituídos nas normas, encontram-se os que são provenientes da normalização do diesel mineral (é a maioria) e os que foram originados de análises dos óleos vegetais e de gorduras animais.

Em face ao exposto, considerando a complexidade e o custo de vários dos procedimentos analíticos constantes nas normas, para o controle da qualidade do biodiesel, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos alternativos que possam ser usados por indústrias de pequeno e médio porte, impossibilitadas em certos casos de usarem os métodos normalizados em função do alto custo. O sucesso em tal empreendimento contribuiria significativamente para a finalidade de inclusão social do programa de biodiesel.

O nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao desenvolvimento de novos métodos de análise para o biodiesel. Os principais métodos desenvolvidos pelo grupo são: determinação da estabilidade oxidativa, determinação do índice de acidez e do índice de iodo, desenvolvimento de métodos alternativos para a determinação dos íons metálicos sódio, potássio, cálcio e magnésio em amostras de biodiesel, etc. Tais métodos por serem simples, de fácil operação, aquisição do equipamento, manutenção e o custo geral relativamente baixo são excelente alternativa aos métodos atualmente normalizados pelas agências regulamentadoras e esta pesquisa trata do desenvolvimento de novas propostas para análise de biodiesel incluindo o estudo da relação entre ponto de fulgor e o teor de álcool residual.

Este trabalho está dividido em quatro capítulos, além das considerações finais, perspectivas, referências bibliográficas e dos anexos. No capítulo 1, intitulado "*biodiesel*" é apresentado uma breve introdução e as principais características físico-químicas deste combustível. O Capítulo 2 apresenta o método desenvolvido para medidas de ponto de fulgor e sua relação com o teor de álcool residual. Neste capítulo estudou-se a relação entre estes dois parâmetros analíticos através da introdução, no biodiesel, de concentrações conhecidas de álcool e, também, por meio de análises por cromatografia a gás para a confirmação desse teor alcoólico.

No capítulo 3, apresenta-se um método espectrofotométrico para a determinação de fósforo em biodiesel. O método proposto é baseado na calcinação da amostra seguido da reação de formação do complexo azul de molibdênio e análise por espectrofotometria de absorção molecular.

Por fim, no capítulo 4 é apresentado um método para a determinação de ânions em biodiesel empregando a cromatografia de íons. Neste capítulo são mostrados os diferentes testes realizados para o preparo da amostra, incluindo o emprego da radiação ultravioleta. Os íons estudados foram acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato.

Ao final da tese encontram-se as considerações finais e as perspectivas.

Capítulo 1: Biodiesel

1- BIODIESEL

1.1-Definição

O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) foi lançado em 6 de dezembro de 2004, com o objetivo de implementação de forma sustentável, tanto técnica, como econômica, da produção e uso do biodiesel com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, via geração de emprego e renda. Este programa culminou com a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, através da Lei nº 11097 de 13 de janeiro de 2005. Esta lei previa inicialmente a adição de 2 % de biodiesel ao diesel mineral (B2), aumentando para 3 % (B3) a partir de 1º de junho de 2008, 4 % (B4) a partir de 1º de julho de 2004 e desde 1º de janeiro de 2010 tornou-se obrigatório a adição de 5 % (B5) de biodiesel ao diesel.

No Brasil, a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), através da Resolução nº 14 de maio de 2012 que revoga a resolução 07/2008 é o órgão responsável pela regulamentação do biodiesel, definindo-o como “um combustível para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão, renovável e biodegradável, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil”.

Considerando a extensão territorial do Brasil, a variedade de clima e solo e a existência de diversificadas opções de matérias-primas oleaginosas, como a palma (dendê), a mamona, a soja, o algodão, o amendoim, o pinhão-manso (*Jatropha curcas L.*), o girassol, gorduras animais e óleos residuais, dentre outras, o governo brasileiro optou por não privilegiar qualquer matéria-prima oleaginosa ou rota tecnológica, deixando a escolha para o produtor, com base em sua análise de custos de produção e de oportunidade. Geralmente, fatores como a geografia, o clima e a economia local determinam quais óleos vegetais apresentam maior interesse e maior potencial para emprego como biodiesel.

Recentemente, alguns estudos têm mostrado o potencial das microalgas como matéria-prima na síntese de biodiesel. Os óleos encontrados nas microalgas possuem características físico-químicas e químicas similares aos de óleos vegetais e por isto elas podem ser consideradas como potencial matéria-prima para a produção de biodiesel e para querosene de aviação, pois produzem essencialmente dois tipos de moléculas utilizáveis, da mesma classe química, mas com tamanhos diferentes, tornando estas duas aplicações complementares. A extração do óleo pode ser realizada com solventes e estudos já mostraram que o rendimento de óleo depende da cultura podendo chegar a 85 % (Quintella *et al.*, 2009). O crescimento e produção das algas dependem de fatores como a temperatura, intensidade da luz e nutrientes, incluindo CO₂ (Knothe, 2011). Tem a vantagem de não competir com o mercado alimentício, no entanto, um dos grandes gargalos da produção de microalgas para a produção de biodiesel está no alto custo de produção. Além disso, os estudos sobre a produção de biodiesel a partir do óleo obtido de microalgas ainda estão no início, enquanto a tecnologia da produção a partir de oleaginosas está bem avançada (Atabani *et al.*, 2012).

1.2. Vantagens do biodiesel frente ao diesel mineral

O combustível diesel derivado do petróleo apresenta estruturas químicas diferentes daquelas dos óleos vegetais e ésteres alquílicos (biodiesel). O óleo diesel contém somente átomos de carbono e hidrogênio, arranjados em estruturas de cadeia que pode ser normal, ramificada ou aromática. Pode conter hidrocarbonetos saturados e insaturados, mas estes últimos não estão presentes em quantidade suficiente para promoverem a oxidação do combustível. São compostos de aproximadamente 75% de hidrocarbonetos saturados (parafinas primárias incluindo normal, iso e cicloparafinas), e 25% de hidrocarbonetos aromáticos (incluindo naftalenos e alquilbenzenos). A fórmula química média é C₁₂H₂₃, variando de aproximadamente C₁₀H₂₀ para C₁₅H₂₈ (Singh e Singh, 2010; Demirbas, 2003). Os óleos e gorduras são formados principalmente por ácidos graxos e estes podem estar livres ou esterificados com glicerol nas formas de

mono-, di- ou triacilgliceróis e ainda podem estar presentes fosfatídios, que são ésteres mistos de glicerina com ácidos graxos e ácido fosfórico. Além dos ácidos graxos e seus derivados, outros em menor quantidade como esteróis, ceras, antioxidantes, vitaminas, também estão presentes, o que faz dos óleos e gorduras uma mistura bastante complexa (Suarez, 2009). Os ácidos graxos comumente encontrados em óleos vegetais são: esteárico, oléico, palmítico, linoléico e linolênico. As moléculas de triglicerídeos têm massa molecular entre 800 e 900 Dalton, sendo cerca de quatro vezes maiores do que as moléculas do óleo diesel mineral (Singh e Singh, 2010; Demirbas, 2003).

Além de ser totalmente compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades, o biodiesel ainda apresenta várias vantagens adicionais em comparação com esse combustível fóssil (Knothe, *et al.*, 2006). As principais vantagens são:

- É derivado de matérias-primas renováveis, reduzindo assim a atual dependência sobre os derivados do petróleo e preservando as suas últimas reservas.
- É biodegradável.
- Apresenta 10 a 11 % de oxigênio, o que lhe confere um alto poder de combustão (Atabani *et al.*, 2012).
- Gera redução nas principais emissões presentes nos gases de exaustão de motores diesel (com exceção dos óxidos de nitrogênio, NO_x).
- Possui um alto ponto de fulgor, o que lhe confere manuseio e armazenamentos mais seguros.
- Apresenta número de cetano (60 a 65 dependendo do óleo vegetal) maior do que o óleo diesel (53) reduzindo assim, o atraso de ignição (Atabani *et al.*, 2012).
- Apresenta excelente lubricidade, fato que vem ganhando importância com o advento do petrodiesel com baixo teor de enxofre, cuja lubricidade é parcialmente perdida durante o processo de produção. A

lubricidade ideal deste combustível pode ser restaurada através da adição de baixos teores de biodiesel.

- Permite melhorar o fechamento do ciclo do carbono e, quando de origem vegetal, intensifica o seqüestro de CO₂ da atmosfera, impactando favoravelmente nas mudanças climáticas do planeta, por implicar na absorção de CO₂ pelas plantas geradoras de óleo compensando, deste modo, a sua liberação ao ar pela sua queima nos motores (Atabani *et al.*, 2012; Quintella, *et al.*, 2009).
- Reduz efeitos ambientais provocados por produtos residuais, pois pode ser obtido a partir de óleos de fritura e gorduras (Atabani *et al.*, 2012).
- O uso de biodiesel com diesel (blendas) em proporções até B20 não requer nenhuma modificação no motor. Misturas em maior proporção necessitam de pequenas modificações (Atabani *et al.*, 2012).

Apesar de todas estas vantagens, o emprego de biodiesel pode causar corrosão nos tanques de combustíveis, tubos e injetores, pois apresenta uma estabilidade oxidativa menor que a do diesel. Ele pode se oxidar na presença do ar formando ácidos graxos. Além disso, outros problemas relacionados a uma menor velocidade do motor e alto desgaste das peças, associado ao custo elevado deste combustível atualmente (Atabani *et al.*, 2012) são ainda alguns desafios a serem vencidos para que o biodiesel possa substituir completamente o óleo diesel de origem mineral.

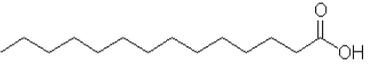
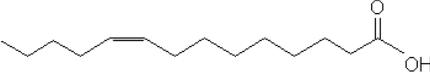
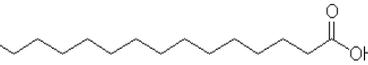
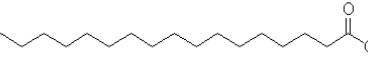
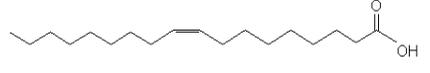
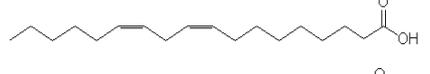
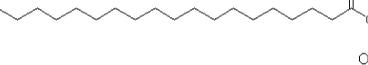
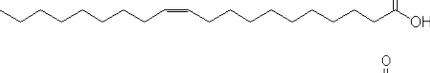
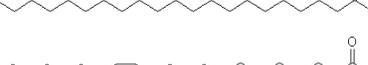
1.3. Características dos óleos vegetais

As propriedades físico-químicas dos óleos vegetais e a reatividade variam enormemente em função da sua composição, o que tem reflexos nas viabilidades técnica e econômica do seu uso como matéria-prima para a produção de um biocombustível e o uso do mesmo (Suarez *et al.*, 2009). Além disso, as substâncias presentes na matéria-prima não refletem apenas nas propriedades

físico-químicas, mas também podem afetar a queima no motor, a formação de depósitos no sistema de injeção e ainda o tipo e a quantidade de substâncias ou gases poluentes emitidos (Dabdoub *et al.*, 2009).

A Tabela 1.1 apresenta os nomes e a estrutura dos principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras.

Tabela 1.1. Ácidos graxos comuns em óleos e gorduras.

Nome usual	Nome oficial	Símbolo	Fórmula molecular	Massa molecular / Dalton	Estrutura química
Ácido láurico	Ácido dodecanóico	12:0	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200,32	
Ácido mirístico	Ácido tetradecanóico	14:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228,38	
Ácido miristoléico	Ácido cis-9-tetradecenóico	14:1	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	226,26	
Ácido palmítico	Ácido hexadecanóico	16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,43	
Ácido palmitoléico	Ácido cis-9-hexadecanóico	16:1	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254,42	
Ácido esteárico	Ácido octadecanóico	18:0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,48	
Ácido oléico	Ácido Cis-9-octadecenóico	18:1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,47	
Ácido linoléico	Ácido cis-9,12-octadecadienóico	18:2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280,46	
Ácido linolênico	Ácido cis-9,12,15-ctadecatrienóico	18:3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278,44	
Ácido araquídico	Ácido eicosanóico	20:0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312,54	
Ácido gondóico	Ácido cis-11-eicosanóico	20:1	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310,53	
Ácido behênico	Ácido docosanóico	22:0	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340,60	
Ácido erúxico	Ácido cis-13-docosenóico	22:1	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	338,58	

Fonte: Hoekman *et al.*, 2012.

A Tabela 1.2 mostra a distribuição dos ácidos graxos em porcentagem para diferentes matérias-primas.

Tabela 1.2. *Distribuição dos ácidos graxos para diferentes óleos e gorduras.*

Matéria- prima	Ácidos graxos (% m/m)									
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0	22:1
Girassol	0,07	6,08	0,08	3,26	16,93	73,73	-	0,26	0,67	-
Canola	0,06	3,49	0,20	0,85	64,40	22,30	8,23	0,57	0,30	1-2
Soja	0,08	10,58	0,09	4,76	22,52	52,34	8,19	0,33	0,43	0-0,3
Milho	0,12	12,12	0,12	2,18	33,04	49,94	0,96	0,49	0,18	-
Óleo de fritura	-	12	-	-	53	33	1,00	-	-	-
Sebo	3-6	24-32	-	20- 25	37-43	2-3	-	-	-	-
Banha	1-2	28-30	-	12- 18	4-50	7-13	-	-	-	-

Fonte: Adaptação da Tabela de composição de alimentos -TACO e Manual de biodiesel, Knothe *et al.*, 2006.

Os óleos vegetais ocupam uma posição proeminente no desenvolvimento de combustíveis alternativos apesar dos problemas associados com o uso direto nos motores diesel. Os principais problemas relacionados ao uso de óleos vegetais diretamente nos motores a diesel, segundo Murugesan *et al.* (2009) são:

- A alta viscosidade do óleo vegetal interfere no processo de injeção e leva a uma baixa atomização (Knothe *et al.*, 2006).
- A mistura ineficiente do óleo vegetal com o ar contribui para uma combustão incompleta, levando a uma alta emissão de fumaça.
- O alto ponto de fulgor está associado a características de baixa volatilidade.
- Diluição do óleo lubrificante.
- Depósitos de carbono.

- Os pontos de nuvem e fluidez são significativamente maiores do que àqueles do diesel. Estes altos valores podem causar problemas em baixas temperaturas.

A alta viscosidade de óleos vegetais é considerada a principal causa para a má atomização do combustível, o que resulta em problemas operacionais como depósitos no motor. Por estas razões, alguns métodos têm sido investigados com o objetivo de reduzir a alta viscosidade dos óleos vegetais e, assim, permitir o seu uso em motores diesel sem problemas operacionais, como a formação de incrustações e depósitos: diluição de 25 partes do óleo vegetal com 75 partes do combustível diesel; microemulsões com álcoois de cadeia curta como metanol ou etanol; decomposição térmica, produzindo alcanos, cicloalcanos e alquilbenzenos; e transesterificação com etanol ou metanol (Atabani *et al.*, 2012; Knothe, *et al.*, 2006; Murugesan *et al.*, 2009). Apenas a transesterificação leva a produtos comumente denominados biodiesel, ou seja, ésteres alquílicos de óleos e gorduras.

1.4. Produção de biodiesel

1.4.1. Reação de transesterificação

O biodiesel é uma mistura de ésteres alquílicos de cadeia linear, obtida da transesterificação dos triacilgliceróis de óleos e gorduras com álcoois de cadeia curta. Esta reação tem como co-produto o glicerol. Entre os álcoois que podem ser usados em reações de transesterificação estão metanol, etanol, propanol e butanol. Metanol e etanol são mais freqüentemente usados, especialmente metanol devido ao baixo custo e às suas vantagens físicas e químicas (Demirbas, 2008; Ma e Hanna, 1999; Sharma *et al.*, 2008; Arzamendi, 2008).

O metanol é mais amplamente aplicado na produção de biodiesel em escala comercial e, por ser mais reativo, implica em menor temperatura e tempo de reação. O etanol, além de ter produção consolidada no Brasil, é consideravelmente menos tóxico, é renovável e produz biodiesel com maior

número de cetano e lubricidade. Uma grande desvantagem do etanol está no fato deste promover uma maior dispersão da glicerina no biodiesel, dificultando a sua separação (Lôbo *et al.*, 2009). Para obtenção de maiores rendimentos na reação de transesterificação costuma-se utilizar excesso de álcool e remoção da glicerina. Para o metanol, a razão molar comumente empregada é de 6:1, enquanto que para o etanol, a razão é de 9:1 a 12:1 (Sharma *et al.*, 2008).

A reação de transesterificação de óleos e gorduras é realizada na presença de catalisadores ácidos, básicos ou enzimáticos. Os catalisadores mais empregados são os catalisadores homogêneos alcalinos, que são mais eficientes, promovendo altos rendimentos. Dentre estes, os alcóxidos são mais ativos, resultando em rendimentos superiores a 98% na reação de transesterificação. No entanto, são mais sensíveis à presença de água. Os hidróxidos de sódio e de potássio, embora menos ativos, apresentam menor custo, promovem rendimentos satisfatórios e têm sido mais amplamente empregados (Lôbo *et al.*, 2009).

A reação total de transesterificação com um álcool primário está esquematizada na Figura 1.1. A principal característica dessa reação é a transformação dos triacilgliceróis em glicerol e três moléculas de éster. Estes ésteres constituem os componentes do biodiesel. Na realidade, o processo de transesterificação nunca ocorre totalmente e após o término da reação, estando presentes triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ésteres, glicerol, álcool e componentes catalíticos e, no caso de catálise básica, sabões (Samios *et al.*, 2009).

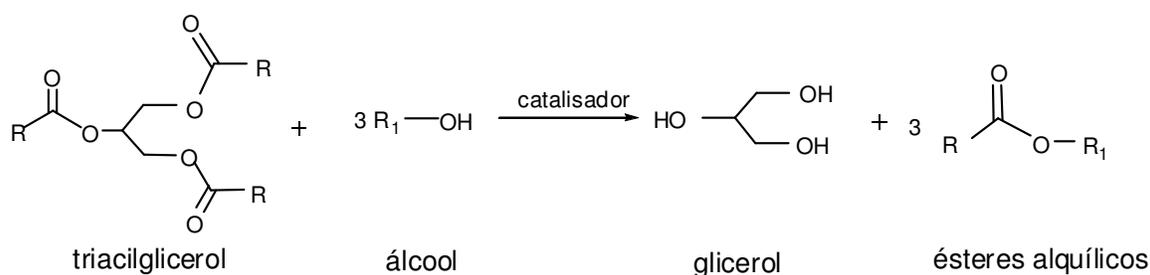


Figura 1.1. Esquema do processo total de transesterificação.

A substituição do metanol de origem fóssil por etanol na produção de biodiesel é um objetivo interessante, pois assim, os ésteres etílicos poderiam ser 100 % derivados da biomassa. Entretanto, o uso de etanol apresenta algumas dificuldades. Em primeiro lugar, a reação é mais lenta do que com metanol: maiores quantidades de catalisador e/ou temperaturas mais altas são necessárias para balancear a menor reatividade do etanol. Em segundo lugar, o etanol é um melhor solvente para óleos e ésteres etílicos.

O etanol atua como um co-solvente e torna o processo de extração do glicerol dos ésteres etílicos mais complexo e dispendioso. Além disso, o teor de água no etanol deve ser baixo, o que introduz uma dificuldade adicional, pois a desidratação do etanol é mais complexa do que a do metanol, devido à formação de azeótropos. Em catálise homogênea, a água é um precursor para a formação de sabão, levando a um aumento do consumo de catalisador e à diminuição da quantidade produzida de éster. Na catálise heterogênea, a água atua como um inibidor do catalisador, mas não afeta o rendimento em ésteres ou a pureza do glicerol. Pesquisas estão em progresso para encontrar maneiras de produzir ésteres etílicos mais economicamente (Casanave *et al.*, 2007).

1.5. Parâmetros de qualidade

O biodiesel comercializado deve atender a uma série de especificações, regulamentadas pelos órgãos responsáveis. No Brasil, a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) através da Resolução 14/2012, especifica os parâmetros de qualidade para o biodiesel comercial e estabelece os limites e os métodos de ensaios para a determinação da qualidade através de métodos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), das normas internacionais da “American Society for Testing and Materials” (ASTM), da “International Organization for Standardization (ISO)” e do “Comitté Européen de Normalisation” (CEN).

Entre os parâmetros instituídos nas normas estão os provenientes da normalização do diesel mineral e os que foram originados de análises de óleos

vegetais, comumente utilizados na indústria oleoquímica. Parâmetros como viscosidade cinemática, ponto de fulgor e cinzas sulfatadas, embora tenham origem na normalização do diesel mineral, fornecem resultados bastante esclarecedores quanto à qualidade do biodiesel.

As propriedades do biodiesel que devem ser analisadas e as especificações de cada propriedade para que seja comercializado, segundo a ANP são mostradas na Tabela 1.3.

Tabela 1.3. Especificação do biodiesel pela ANP, resolução 14/2012.

Característica	Unidade	Limite	Método		
			ABNT	ASTM D	EN/ISO
Aspecto		Límpido e isento de impurezas	-	-	-
Massa específica 20 °C *	kg/m ³	850-900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40 °C *	mm ² /s	3,0-6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água, máx. *	mg/kg	(1)	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	EN ISO 12662
Ponto de fulgor, mín. *	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín.	% massa	96,5	15764	-	EN 14103
Resíduo de carbono	% massa	0,050	15586	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx. *	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx. *	mg/kg	10	15867	5453	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Cálcio + Magnésio	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3 h a 50 °C, máx. *	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número de cetano *	-	Anotar	-	613 6890	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx. *	°C	(2)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	EN14104
			-	-	

(Continua na próxima página)

Tabela 1.3. Especificação do biodiesel pela ANP, resolução 14/2012. (Continuação).

Característica	Unidade	Limite	Método		
			ABNT	ASTM D	EN/ISO
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341	6584	EN 14105
			15771		EN 14106
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344	6584	EN 14105
Monoacilglicerol	% massa	0,80	15908	6584	EN 14105
			15342		
			15344		
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15908	6584	EN 14105
			15342		
			15344		
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15908	6584	EN 14105
			15342		
			15344		
Metanol ou etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de iodo	g/100 g	Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação a 110 °C, mín.	h	6	-	-	EN 14112 EN 15751

* Parâmetros típicos da normalização do diesel mineral.

Notas:

(1) Será admitido o limite de 380 mg kg⁻¹ 60 dias após a publicação da resolução. A partir de 1° de janeiro de 2013 até 31 de dezembro de 2013 será admitido o limite máximo de 350 mg kg⁻¹ e a partir de 1° de janeiro de 2014, o limite máximo será de 200 mg kg⁻¹.

(2) Limites conforme Tabela 1.4. Para os estados não contemplados na tabela o ponto de entupimento a frio permanecerá 19 °C.

Tabela 1.4. *Ponto de Entupimento de Filtro a Frio.*

Unidades da Federação	Limite máximo, °C											
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
SP – MG - MS	14	14	14	12	8	8	8	8	8	12	14	14
GO/DF – MT – ES - RJ	14	14	14	14	10	10	10	10	10	14	14	14
PR – SC - RS	14	14	14	10	5	5	5	5	5	10	14	14

As normas e os métodos especificados pela ANP (Tabela 1.3) em geral, envolvem equipamentos caros e sofisticados e consomem grande quantidade de solventes e reagentes. Sendo assim, é importante o desenvolvimento de métodos alternativos, em especial os de baixo custo que possam contribuir para o controle de qualidade do biodiesel produzido por indústrias de pequeno e médio porte. Recentemente muitos pesquisadores têm se dedicado ao desenvolvimento de métodos específicos para o controle de qualidade do biodiesel, como mostrado nos artigos de revisão de Monteiro *et al.* (2008), Lôbo *et al.* (2009) e Lepri *et al.* (2011).

Uma pesquisa das publicações indexadas no banco de dados *Web of Science* com o termo biodiesel e refinada para uma pesquisa por país possibilitou a construção de um gráfico que mostra os principais países que geram conhecimento científico sobre biodiesel. Os dados dessa pesquisa são mostrados na Figura 1.2.

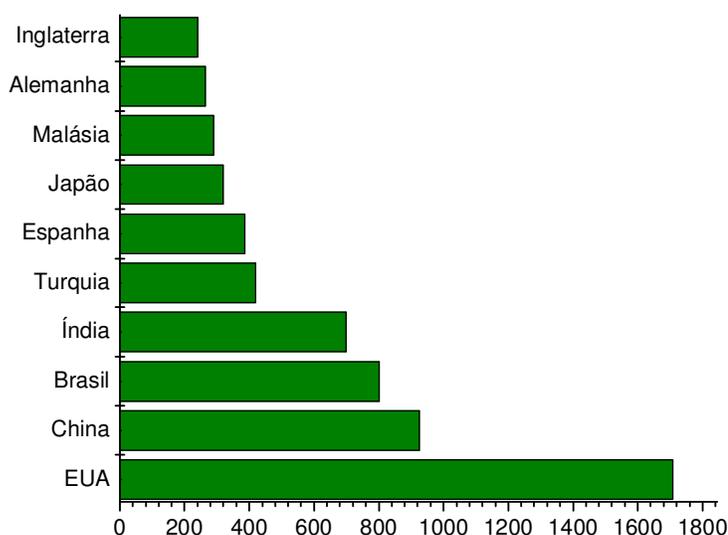


Figura 1.2. *Número de publicações sobre biodiesel no período de 1992 a 2012. Pesquisa realizada no banco de dados “Web of Science”.*

Percebe-se a partir desses dados que os Estados Unidos lideram em número de publicações, logo atrás vem China e o Brasil ocupa o terceiro lugar. Esses dados mostram que a participação da ciência brasileira neste tema está se firmando em nível internacional.

No entanto, uma nova busca foi realizada com o objetivo de verificar o avanço anual das pesquisas sobre biodiesel no Brasil e no mundo no mesmo período e o resultado está mostrado na Figura 1.3.

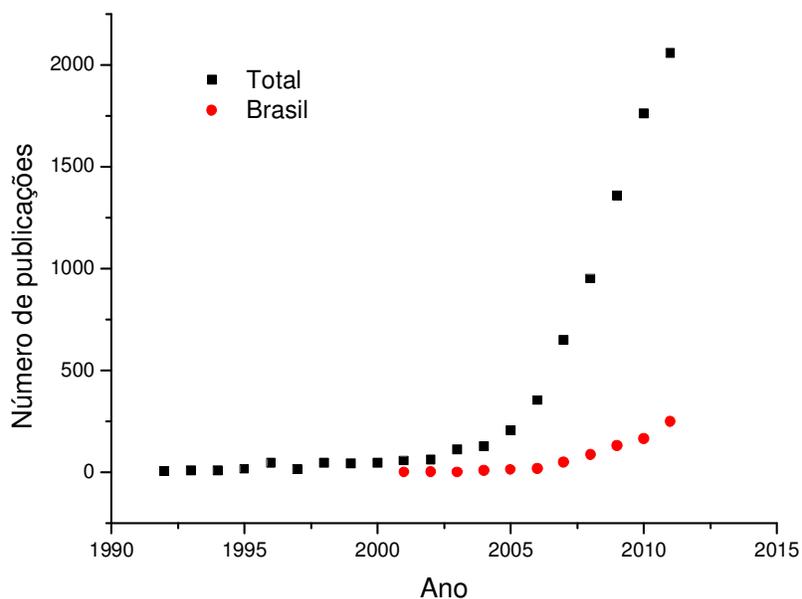


Figura 1.3. *Evolução anual do número de publicações entre 1992 e 2011. Pesquisa realizada no banco de dados “Web of Science”.*

O gráfico mostrado na Figura 1.3 destaca o papel do Brasil na geração do conhecimento científico. Pode se notar que a partir de 2004 quando o governo implementou o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) que culminou com a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira em 2005, ocorreu um aumento do número de publicações que continua até os dias de hoje. Esse aumento no número de publicações se deve principalmente à necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos específicos para biodiesel, pois estudos visando o acompanhamento e a melhoria da qualidade e dos métodos de sua análise são importantes para garantir a eficiência do combustível, minimizando os efeitos ambientais e os possíveis danos à saúde.

A seguir serão discutidas algumas das propriedades do biodiesel.

1.5.1. Viscosidade cinemática

A viscosidade é a medida da fricção interna ou resistência de um óleo ao fluxo. Quando a temperatura do combustível é aumentada, sua viscosidade diminui e por isso, flui mais facilmente. A viscosidade é a propriedade mais importante do biodiesel, pois afeta a operação de injeção do combustível, particularmente a baixas temperaturas quando um aumento na viscosidade afeta de modo desfavorável a fluidez do combustível. Alta viscosidade leva à baixa nebulização do combustível e provoca a operação menos acurada dos injetores de combustível (Demirbas, 2008). Os valores de viscosidade para óleos vegetais geralmente estão entre 23,2 e 53,0 mm²/s enquanto a viscosidade cinemática a 40 °C dos ésteres alquílicos de óleos vegetais deve ser entre 3,0 e 6,0 mm²/s. A viscosidade dos ésteres de óleos vegetais diminui após o processo de transesterificação. A diferença da viscosidade entre o óleo vegetal de origem e o seu derivado alquil éster pode ser utilizada para monitorar a produção de biodiesel (Knothe *et al.*, 2006).

1.5.2. Número de cetano

Assim como a octanagem no caso da gasolina, 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. O número de cetanos aumenta com o comprimento da cadeia carbônica não ramificada, desta forma, o hexadecano (cetano) é estabelecido como padrão de valor de 100 na escala de cetano, enquanto que para o 2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano é atribuído o valor 15. O teste de cetano é realizado em um motor de bancada de quatro tempos, com um único cilindro e ignição por compressão, projetado para testes de amostras de combustíveis para motores diesel (Knothe *et al.*, 2006).

O biodiesel tem número de cetano maior que o diesel mineral e apresenta, portanto, uma maior eficiência na combustão (Atabani *et al.*, 2012). A

ANP não estabelece um valor mínimo para o número de cetano, sendo necessário apenas o registro do valor medido.

1.5.3. Estabilidade à oxidação a 110 °C

A estabilidade oxidativa do biodiesel está diretamente relacionada com o grau de insaturação dos ésteres alquílicos presentes, como também, com a posição das duplas ligações na cadeia carbônica. Quanto maior o número de insaturações, mais susceptível está a molécula à degradação tanto térmica como oxidativa, formando produtos insolúveis que ocasionam problemas de formação de depósitos e entupimento do sistema de injeção de combustível do motor (Lôbo *et al.*, 2009). Óleos vegetais geralmente contêm antioxidantes de ocorrência natural como os tocoferóis. Antioxidantes naturais dos óleos vegetais promovem uma maior estabilidade à oxidação, no entanto, estes podem ser perdidos durante o processo de refino ou por degradação térmica (Knothe, 2006).

A alta temperatura e a exposição ao ar são fatores que afetam a estabilidade do biodiesel e este efeito pode ser ainda mais significativo quando estes dois fatores atuam ao mesmo tempo. O biodiesel também é potencialmente susceptível à degradação hidrolítica, causada pela presença de água (Knothe *et al.*, 2006). A estabilidade oxidativa está relacionada com o grau de insaturação. Em geral, maior insaturação leva a uma baixa estabilidade, sendo assim, a oxidação de compostos graxos insaturados ocorre em diferentes velocidades a depender do número e a posição das ligações duplas (Knothe *et al.*, 2006).

A norma relacionada à estabilidade oxidativa de biodiesel (EN 14112) estabelece que ela deve ser determinada a 110 °C pelo método Rancimat, exigindo um valor mínimo de 6 h para o período de indução. Neste método, uma amostra de biodiesel é mantida em um vaso de reação, na temperatura de 110 °C e sob um fluxo de ar constante. Neste momento começam a se formar os peróxidos, que são os principais produtos formados na primeira etapa de oxidação do biodiesel. Com o processo de oxidação continuada, são formados compostos orgânicos voláteis, dentre estes, ácidos orgânicos de baixa massa molecular.

Estes compostos são transportados pelo fluxo de ar para outro recipiente contendo água destilada, onde a presença dos ácidos orgânicos é então detectada pelo aumento da condutividade no sistema. O tempo decorrente até a detecção dos ácidos orgânicos é denominado de período de indução (Lôbo *et al.*, 2009).

1.5.4. Índice de iodo

O índice de iodo é um parâmetro empregado na indústria de óleos e indica o grau de insaturação, ou seja, o número de ligações duplas presentes na molécula de óleo (Lapuerta *et al.*, 2009). O número de insaturações não tem apenas efeito nos valores de densidade e de viscosidade do biodiesel, mas também é de grande importância na estabilidade oxidativa (Knothe *et al.*, 2006). O índice de iodo é determinado pela medida da quantidade de I_2 que reage completamente com 100 gramas de biodiesel. É importante avaliar o índice de iodo em biodiesel, pois quanto maior o índice de iodo, maior será a tendência dos componentes insaturados através de reações de polimerização de formar depósitos nos motores (Knothe, 2002). O valor máximo aceito na norma EN 14214 é 120 g I_2 /100 g. A ANP solicita o registro da análise.

Aricetti *et al.* (2009) desenvolveram um método limpo para determinação de iodo em biodiesel baseado no procedimento de Friedman já empregado para análise de óleos e gorduras. As soluções reagentes são preparadas em água, com exceção do padrão de iodo e as soluções de biodiesel que são dissolvidas em etanol 96 %. O método apresentou resultados equivalentes ao método de Wijs, que é regulamentado pela norma EN 14111.

1.5.5. Teor de água

A contaminação do biodiesel pela presença de água pode contribuir para o crescimento bacteriano, corrosão de tanques de estocagem com deposição de sedimentos (Atabani *et al.*, 2012; Knothe *et al.*, 2006;) e combustão pobre

(Sandum, *et al.*, 2007). Além disso, pode ainda promover a hidrólise do biodiesel resultando em ácidos graxos livres (Lôbo *et al.*, 2009). A ANP adota o método coulométrico (Karl Fischer) EN ISO 12937 para determinação do teor de água e a concentração máxima aceitável de água no biodiesel atualmente é 500 mg kg^{-1} (ANP 07/2008) e será de 200 mg kg^{-1} a partir de 1º de janeiro de 2014 (ANP 14/2012).

1.5.6. Índice de acidez

O número de acidez é um parâmetro que informa a quantidade de ácidos graxos livres e de ácidos originados das reações de degradação do biodiesel, por exemplo, devido à hidrólise e oxidação dos triglicerídeos e dos monoésteres.

O monitoramento da acidez no biodiesel é de grande importância durante a estocagem, pois a alteração dos valores neste período pode significar a presença de água (Lôbo *et al.*, 2009). Número de acidez muito alto pode gerar depósitos sólidos nos bicos de injeção, além de contribuir para a corrosão em tanques de estocagem (Tubino e Aricetti., 2011).

O método recomendado pela EN 14214 é o EN 14104, que utiliza uma solução alcoólica de KOH como titulante e fenolftaleína como indicador. A ASTM recomenda o método potenciométrico D 664. Todas as normas estabelecem um limite máximo de acidez de $0,5 \text{ mg de KOH/g}$. Tubino e Aricetti (2011) desenvolveram um método para a determinação do índice de acidez em biodiesel. No trabalho, os autores propõem a dissolução da amostra de biodiesel em etanol/água evitando a mistura tolueno:isopropanol:água, que é empregada nos métodos normalizados. O método apresentou resultados equivalentes ao método ABNT NBR 14448 que também é adotado pela ANP, apresentando maior precisão e sendo, portanto, uma alternativa já que se trata de um método limpo, principalmente por não empregar solventes orgânicos.

1.5.7. Glicerina livre e total

A glicerina é um co-produto da reação de transesterificação de óleos e gorduras. A determinação da glicerina residual serve como parâmetro para avaliar a eficiência do processo de purificação do biodiesel. Altas concentrações de glicerina no biodiesel provocam problemas de armazenamento, pois quando o biodiesel é misturado com o diesel de petróleo, observa-se a separação da glicerina nos tanques de estocagem. Problemas como formação de depósitos, entupimento dos bicos injetores do motor e emissões de aldeídos também estão relacionados com a alta concentração da glicerina no biodiesel (Lôbo *et al.*, 2009). Segundo Knothe (2000), a quantidade de glicerina e glicerídeos presentes no biodiesel são os principais fatores na determinação da qualidade desse biocombustível.

A glicerina residual pode ser facilmente eliminada através de lavagens do biodiesel com água. Embora seja praticamente insolúvel no biodiesel, a glicerina pode ser encontrada dispersa na forma de gotículas. A presença de sabões residuais pode interferir, aumentando a concentração de glicerina no biodiesel devido à formação de emulsões (Lôbo *et al.*, 2009).

O teor máximo permitido de glicerina livre no biodiesel é 0,02 % m/m e a sua determinação é realizada através dos métodos cromatográficos EN ISO 14105, EN 14106, ASTM D 6584 e do método volumétrico NBR 15771.

A glicerina combinada, que inclui mono-, di- e triglicerídeos, é proveniente da reação incompleta dos glicerídeos, logo este é um parâmetro importante para avaliar a eficiência da conversão de óleos e gorduras em biodiesel. A glicerina combinada pode ser calculada a partir das concentrações de mono-, di- e triglicerídeos, aplicando-se fatores de conversões individuais baseados na massa molar média dos ácidos graxos que participam da composição da matéria-prima. Dependendo da concentração em que podem estar presentes no biodiesel, os glicerídeos não reagidos podem aumentar a viscosidade do combustível e, conseqüentemente, reduzir a eficiência da combustão, provocando entupimento do filtro de combustível e formação de depósitos em partes do motor como

pistões, válvulas e bicos injetores. A soma da glicerina livre com a glicerina combinada é chamada de glicerina total. Em relação ao teor de glicerina total, a ANP e a norma européia estabelecem um limite máximo de 0,25 % m/m, enquanto nos Estados Unidos o limite é de 0,24 % m/m (Lobo *et al.*, 2009).

Há muitos métodos descritos na literatura que tratam da determinação de glicerina livre e total em biodiesel e suas misturas, como métodos empregando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (CG) (Monteiro *et al.*, 2008). A cromatografia a gás em altas temperaturas (*High temperature gás chromatography* – HTGC) ainda é a técnica cromatográfica mais utilizada para análise de glicerina livre e total em biodiesel. A ANP recomenda os métodos cromatográficos NBR 15908, ASTM 6584, EN 14105 e o método iodométrico NBR 15344 para a determinação do teor de glicerina total em biodiesel.

1.5.8. Teor de éster

A determinação do teor de ésteres metílicos em biodiesel, segundo a ANP, deve ser realizada através dos métodos EN 14103 e NBR 15764. A porcentagem mínima exigida de ésteres é de 96,5 % m/m. Os dois métodos normalizados envolvem cromatografia gasosa. A massa do éster é obtida através da comparação da área total dos picos correspondentes com a área do pico heptadecanoato de metila, utilizado como referência. O teor de éster também pode ser avaliado por ressonância nuclear magnética protônica (próton nuclear magnetic resonance – $^1\text{H-NMR}$). O cálculo da taxa de conversão em ésteres metílicos se baseia na razão entre a área do singlete dos prótons da metila, diretamente ligada à carboxila do metil éster ($\text{CH}_3\text{OCO-}$), e a área dos sinais dos seus prótons metilênicos α -carbonílicos ($-\text{OCOCH}_2-$). O resultado é então, multiplicado pelo fator 2/3, que corresponde à quantidade de átomos de hidrogênio presentes na molécula dos ésteres metílicos envolvidos no cálculo, ou seja, há dois hidrogênios carbonílicos e três hidrogênios metoxílicos. Desta forma, iguale-se a área dos sinais dos prótons envolvidos (Gelbard *et al.*, 1995).

A quantificação do teor de ésteres etílicos foi proposta por Costa Neto *et al.* (2004), empregando-se a área do sinal dos prótons metilênicos da porção glicerol do triglicerídeo e a área do quarteto gerado pelos prótons CH₂ etoxílico do etiléster. Os resultados foram comparados com medidas de viscosidade, obtendo-se um coeficiente de correlação linear de 0,9981. Os métodos empregando ¹H RMN são muito utilizados na academia, no monitoramento das reações de transesterificação, uma vez que a ANP ainda regulamenta apenas os métodos cromatográficos.

Capítulo 2: Estudo da relação entre ponto de fulgor e o teor de álcool residual

1. OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho descrito neste capítulo consistem no estudo da correlação existente entre o teor de álcool residual e o ponto de fulgor de amostras de biodiesel obtidas de diferentes óleos e de gorduras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica referente a este capítulo aborda a definição de ponto de fulgor, a correlação deste parâmetro com outras propriedades, sobretudo com álcool residual e os principais métodos analíticos usados para a determinação do teor de álcool em biodiesel.

2.1. Definição

O ponto de fulgor corresponde à temperatura mínima em que é observada a liberação de vapores de um líquido, em quantidade suficiente para formar uma mistura inflamável com o ar. O ponto de fulgor do biodiesel é um parâmetro dependente do processo produtivo, inclusive da matéria prima utilizada. Para o biodiesel os valores de ponto de fulgor são, consideravelmente, mais elevados que os valores encontrados para o diesel mineral (Lôbo *et al.*, 2009). O ponto de fulgor de uma substância depende do seu ponto de ebulição e, conseqüentemente da sua estrutura química (Pinzi *et al.*, 2011).

Em relação aos valores de ponto de fulgor permitidos para o biodiesel, a norma ASTM D6751 (método analítico D93) é a mais restritiva, fixando um valor mínimo de 130 °C, enquanto a norma EN 14214 (método analítico EN ISO 3679) estabelece o valor de 120 °C e a ANP recomenda, além dos métodos citados, o método ABNT NBR 14598 e um valor de no mínimo 100 °C.

O método ASTM D 93 estabelece que as medidas de ponto de fulgor devem ser realizadas em equipamento Pensky-Martens de vaso fechado. No entanto, é possível fazer a predição dos valores de ponto de fulgor através de

comparações com os dados de pressão de vapor de misturas binárias e modelos matemáticos (Guo *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009). É possível ainda a determinação simultânea deste parâmetro e outras propriedades de misturas diesel/biodiesel através de análises de espectros obtidos por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e modelos de calibração multivariada (Ferrão *et al.*, 2011). Modelos de calibração multivariada têm sido empregados para prever parâmetros como ponto de fulgor, viscosidade, número de cetano, teor de água, entre outras propriedades em misturas diesel/biodiesel, principalmente com o objetivo de verificar a proporção máxima de biodiesel no diesel mineral sem alterar as suas especificações (Bezergianni *et al.*, 2011). Su e Li (2011) observaram que o ponto de fulgor, a viscosidade e o número de cetano dependem do número de átomos de carbono e do número de ligações duplas presentes nas moléculas dos ésteres constituintes do biodiesel. Assim sendo, desenvolveram equações matemáticas capazes de prever tais propriedades.

Algumas propriedades físicas do biodiesel podem estar correlacionadas entre si ou com a presença de impurezas. Cernoch *et al.* (2010) estudaram a relação existente entre algumas propriedades do biodiesel, por exemplo, ponto de fulgor e impurezas presentes no biodiesel de canola obtido por rota etílica. Os autores observaram que o ponto de fulgor depende do teor de etanol presente no biodiesel. A presença de triglicerídeos não convertidos em ésteres também pode ser avaliada através do ponto de fulgor, pois quanto maior o teor de óleo vegetal não convertido, maior será a quantidade de triglicerídeos de alto peso molecular, o que leva a uma diminuição da volatilidade (Fernando *et al.*, 2007). Quanto maior a viscosidade do biodiesel, maior será o ponto de fulgor do combustível, assim como quanto mais elevado o ponto de fulgor mais alta será o calor específico do biodiesel (Demirbas, 2008).

Um estudo realizado por Torres-Jimenes *et al.* (2010) indica que a adição de etanol ao biodiesel melhora o desempenho do combustível e não há necessidade de aditivos para melhorar a estabilidade da mistura etanol/biodiesel a baixas temperaturas. O estudo ainda mostra que uma proporção de até 15 % de

etanol e 85 % de biodiesel pode ser recomendada, pois há uma melhora nas propriedades como ponto de entupimento de filtro a frio, ponto de nuvem e ponto de fluidez quando empregado a baixas temperaturas. No entanto, em relação ao ponto de fulgor da mistura, esta apresentará ponto de fulgor muito influenciado pelo dos componentes mais voláteis, no caso, etanol. Assim, nesses casos, seria necessário o uso de aditivos para aumentar o ponto de fulgor.

2.2. Álcool residual

Álcool residual presente em pequenas quantidades no biodiesel provoca diminuição no ponto de fulgor. Dessa forma, de acordo com as regulamentações para biodiesel, o teor de álcool e o ponto de fulgor devem ser determinados para o biodiesel produzido (Boog *et al.*, 2011). O teor de álcool no biodiesel pode ser utilizado também para avaliar o processo de purificação do biodiesel.

O teor de metanol ou etanol residual especificado para biodiesel é de no máximo 0,2 % m/m. Os métodos padrão para determinação são EN ISO 14110, indicado pela norma EN 14214 e NBR 15343, pela ANP 14/2012 para a determinação tanto de metanol como de etanol. Tais métodos empregam cromatografia gasosa.

2.3. Métodos analíticos para a determinação de álcool residual

A maioria dos métodos para a determinação do teor de álcool envolve cromatografia gasosa. No método EN ISO 14110, emprega-se um cromatógrafo equipado com uma coluna capilar polar e detector de ionização em chama (FID). A amostra é incubada a 80 °C e uma fração da fase gasosa é injetada no cromatógrafo. Utiliza-se 2-propanol como padrão interno.

O método proposto por Arzamendi *et al.* (2006) além de metanol é adequado para determinar simultaneamente outras propriedades, a quantidade de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ésteres metílicos de ácidos graxos e glicerina livre em biodiesel de óleo de girassol. O método envolve cromatografia

por exclusão de tamanho, apresenta boa reprodutibilidade, é um método simples, robusto, relativamente rápido, no entanto, o alto custo das colunas cromatográficas pode ser um inconveniente para o seu uso no monitoramento da reação de transesterificação. Parashivescu *et al.* (2008) propuseram um método alternativo para a determinação de metanol em biodiesel utilizando headspace e microextração em fase sólida (solid phase microextraction – SPME). No trabalho, empregou-se fibra de polidimetilsiloxano para extração e pré-concentração do metanol da amostra em frasco hermeticamente fechado a 50 °C sob agitação constante. Após a adsorção, o metanol é injetado no cromatógrafo a gás por dessorção a 200 °C durante 2 minutos. O método empregando SPME mostrou-se reprodutível e apresenta uma vantagem em relação ao método EN ISO 14110, pois não há necessidade do uso de padrão interno.

Além dos métodos cromatográficos outros métodos envolvendo outras técnicas de análise têm sido desenvolvidos para a determinação de álcool em biodiesel. Araújo *et al.* (2008) desenvolveram um método para a determinação de metanol por análise em fluxo. No trabalho, utilizou-se uma membrana hidrofílica mesoporosa para extrair o metanol da amostra de biodiesel e o teor de metanol é determinado por medidas UV (a 420 nm). Os resultados obtidos pelo método por injeção em fluxo são comparáveis àqueles obtidos por cromatografia gasosa e, além disso, a metodologia proposta é ambientalmente correta e apresenta um custo mais baixo quando comparado ao método de referência.

Felizardo *et al.* (2007) propuseram um método baseado na espectroscopia na região do infravermelho próximo para determinação de metanol em biodiesel. O método baseia-se numa análise qualitativa dos espectros obtidos por espectroscopia NIR através das componentes principais (PCA) e um modelo de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS) foi usado para desenvolver modelos de calibração entre os dados analíticos e espectrais. Através deste modelo foi possível quantificar os teores de metanol e água em biodiesel de óleo de soja e de óleo de frituras, amostras de biodiesel em escala laboratorial, como também em amostras industriais. Os resultados obtidos fortalecem o uso da

espectroscopia NIR em combinação com calibração multivariada no controle de qualidade do biodiesel.

Dorado *et al.* (2011) desenvolveram um método para a determinação de metanol e glicerol em biodiesel por espectroscopia na região do visível e infravermelho próximo. Altas concentrações de glicerina no biodiesel provocam problemas de armazenamento, pois quando o biodiesel é misturado com o diesel de petróleo, observa-se a separação da glicerina nos tanques de estocagem. Problemas como formação de depósitos, entupimento dos bicos injetores do motor e emissões de aldeídos também estão relacionados com a alta concentração da glicerina no biodiesel. Portanto, é de grande importância a determinação da quantidade de glicerina presente no biodiesel. No trabalho proposto por Dorado e colaboradores foi possível determinar os teores de glicerina e metanol em biodiesel. As amostras de biodiesel foram fortificadas com metanol e glicerol e em seguida, analisadas numa faixa de comprimento de onda de 400 a 2500 nm. A primeira derivada do espectro foi calculada e comparada com os dados ópticos sem tratamento por meio da regressão dos mínimos quadrados parciais modificado (MPLS). O método proposto é de custo relativamente baixo e apresenta vantagens no que diz respeito ao tempo de análise, pois cada análise gasta um tempo inferior a dois minutos.

De maneira geral, nos últimos anos muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de propor novos métodos para a determinação de álcool residual em biodiesel e estes métodos envolvem outras técnicas como espectroscopias de absorção molecular na região do visível e infravermelho próximo associado à calibração multivariada.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e Soluções

As amostras de biodiesel foram sintetizadas em nosso laboratório e foram empregados óleos refinados de soja, milho, canola e girassol. Utilizou-se álcool metílico 99,8 % (Synth) ou álcool etílico 99,5 % (Synth) na reação de transesterificação e como catalisador empregou-se uma solução de metóxido de sódio 30 % m/m em metanol (Vetec).

3.2. Procedimento Experimental

3.2.1. Síntese do biodiesel

Os óleos vegetais refinados de diferentes oleaginosas (soja, milho, canola e girassol) foram adquiridos no comércio local e empregados diretamente na síntese.

O sebo bovino foi obtido de um frigorífico e submetido a um processo de purificação. O sebo bovino foi aquecido em estufa a 70 °C e após adicionou-se 1,0 % m/m de óxido de cálcio em relação à massa de sebo. Aqueceu-se a mistura sob agitação por 2 h a 90 °C. Em seguida, filtrou-se a mistura a quente sob vácuo.

O procedimento empregado na síntese do biodiesel foi otimizado pelo nosso grupo de pesquisa. A reação de transesterificação foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa adicionou-se 16 % (m/m) de metanol e 0,56 % (m/m) de catalisador (metóxido de sódio 30 % m/m), calculados em relação à massa do óleo vegetal ou sebo bovino. O sistema foi aquecido à temperatura de aproximadamente 60 °C por 1 hora, sob sistema de refluxo. Após a reação, os produtos obtidos foram colocados num funil de separação de 2 L para separar os ésteres (fase menos densa) do glicerol. Os ésteres foram novamente submetidos à reação com adição de 4,0 % m/m de metanol e 0,14 % do catalisador. Após

outra separação a fase superior foi lavada com cinco porções de 100 mL de água desionizada para remoção das impurezas (metanol, catalisador e glicerina residual) e filtrada em resina *Amberlite BD10 Dry* para remoção de monoglicérides, diglicérides, triglicérides, álcool e catalisador residual. Em seguida, o biodiesel produzido foi submetido a aquecimento a uma temperatura de 110 °C por 1 hora para completar o processo de secagem e a eliminação do álcool residual.

Para a síntese do biodiesel etílico seguiu-se o mesmo procedimento, exceto pela massa de etanol que foi duas vezes àquela de metanol (40% m/m).

Este procedimento foi empregado para a síntese de todas as amostras de biodiesel estudadas neste trabalho.

3.2.2. Procedimentos para avaliação do teor de álcool residual

3.2.2.1. Preparo de amostras

Para verificar a relação entre o ponto de fulgor e o teor de álcool, diferentes amostras de biodiesel foram contaminadas com álcool numa faixa de 0,0 % a 1,0 % m/m, pesando numa balança analítica (Shimadzu AX200). Para os ésteres metílicos, adicionou-se metanol e para os ésteres etílicos adicionou-se etanol. O procedimento foi realizado em triplicata.

3.2.2.2. Medidas do ponto de fulgor

As medidas de ponto de fulgor foram realizadas conforme o método D93 da ASTM D6751. Utilizou-se um aparelho de ponto de fulgor de vaso fechado Pensky-Martens, marca Quimis, modelo 292 A. O equipamento empregado nas medidas está ilustrado na Figura 2.1.

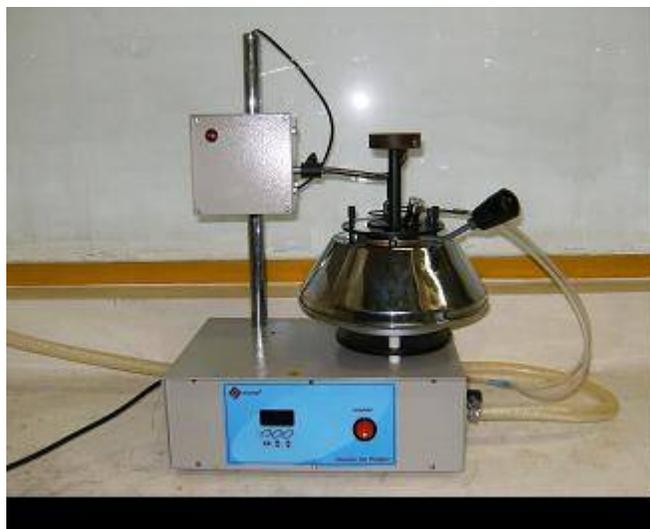


Figura 2.1. *Equipamento Pensky-Martens de vaso fechado. Marca Quimis.*

O método consiste no aquecimento de aproximadamente 65 mL de amostra, mantida sob agitação. Uma chama teste é aplicada a partir de cerca de 23 ± 5 °C abaixo do ponto de fulgor esperado, no caso para o biodiesel puro, considerou-se um mínimo de 100 °C, e após o teste é realizado a cada 1 °C. A temperatura em que os vapores da amostra entram em ignição corresponde ao ponto de fulgor da amostra e deve ser registrada.

3.2.2.3. Cromatografia a gás

O teor de metanol introduzido por pesagem no biodiesel de óleo de milho foi confirmado por cromatografia a gás para verificar a exatidão da adição do álcool.

O teor de metanol nas amostras de biodiesel foi quantificado utilizando um equipamento de Cromatografia a gás com detector de ionização em chama, marca Agilent 6890 N, Headspace CombiPal – CTC Analytics. Pipetou-se 2,0 mL, com precisão de 0,1 mL, da amostra em um frasco de headspace, ultrassonificou por 5 minutos e incubou-se a 80 °C durante 45 minutos com agitação a 500 rpm. Após

acondicionamento, 500 μL do vapor da amostra foi injetado no cromatógrafo. Condições cromatográficas: coluna RTX-1-Restek-10184; temperatura do forno: 50 $^{\circ}\text{C}$; temperatura do injetor: 150 $^{\circ}\text{C}$; temperatura do detector: 150 $^{\circ}\text{C}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas amostras de biodiesel sintetizadas a partir de óleos vegetais (milho, soja e girassol) e sebo bovino. No caso do óleo de soja, os ésteres etílicos também foram sintetizados. As amostras de biodiesel foram cuidadosamente lavadas com água e secas a 110 °C. O ponto de fulgor foi determinado e o processo foi repetido até um valor constante, supondo que nesse caso, o álcool residual foi completamente removido. Para o biodiesel de milho, determinou-se o teor de metanol residual por cromatografia a gás para confirmar a ausência de álcool residual no biodiesel purificado. Este resultado é mostrado na Tabela 2.1 no caso do biodiesel de milho, confirmando teor de metanol muito baixo (< 0,004 % m/m).

Para verificar a dependência do ponto de fulgor em relação ao teor de álcool residual do biodiesel, metanol ou etanol foram adicionados às amostras. A quantidade adicionada foi medida em termos de massa. Para confirmar que o procedimento, ou seja, que a adição e a homogeneização, estavam corretos, o biodiesel de óleo de milho, no qual adicionou-se metanol numa ampla faixa (0,0 – 1,0 % m/m) foi analisado por cromatografia a gás. Os resultados obtidos para o biodiesel de milho são apresentados na Tabela 2.1 onde uma excelente concordância entre a quantidade adicionada e a encontrada foi observada. Foi aplicada a comparação estatística usando o teste-t a um nível de confiança de 95 %. Em todos os casos, $t_{cal} < t_{crit}$.

Tabela 2.1. Teor de metanol em biodiesel metílico de milho e ponto de fulgor após adição de quantidades conhecidas de metanol. Para $\alpha = 0,05$, valor do t crítico = 4,30 ($n=3$).

Metanol adicionado % m/m	Teor de metanol encontrado CG % m/m \pm DP	t_{cal}	Ponto de fulgor $^{\circ}\text{C} \pm \text{DP}$
0,000	<0,004	-	178 \pm 5
0,123	0,128 \pm 0,005	1,73	105 \pm 8
0,220	0,215 \pm 0,009	0,96	82 \pm 5
0,300	0,312 \pm 0,012	1,73	68 \pm 3
0,419	0,420 \pm 0,017	0,14	58 \pm 3
0,517	0,522 \pm 0,021	0,41	53 \pm 3
0,567	0,539 \pm 0,022	2,20	46 \pm 1
0,696	0,685 \pm 0,027	0,41	44 \pm 3
0,827	0,840 \pm 0,034	0,66	37 \pm 1
0,899	0,909 \pm 0,036	0,48	35 \pm 1
1,007	1,010 \pm 0,040	0,13	33 \pm 3

Sendo assim, pôde-se assumir que para as outras amostras, usando os mesmos procedimentos de síntese e de lavagem, os valores das concentrações de metanol ou etanol adicionadas por massa são confiáveis, por exemplo, não houve perda no preparo da amostra. Conseqüentemente, as quantidades de álcool adicionadas podem ser assumidas como corretas. Para cada solução de biodiesel, o ponto de fulgor foi determinado três vezes e uma média foi calculada. Os resultados das medidas de fulgor das amostras de biodiesel de óleos de soja, girassol e sebo bovino com adição de álcool são mostrados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Ponto de fulgor para biodiesel de soja obtido por rota metílica e etílica após adição de quantidades conhecidas de metanol ou etanol. Os valores de ponto de fulgor são as médias de três determinações independentes.

Biodiesel Metílico (soja)		Biodiesel Etílico (soja)	
Metanol adicionado % m/m	Ponto de fulgor °C ± DP	Etanol adicionado % m/m	Ponto de fulgor °C ± DP
0,000	157 ± 3	0,000	166 ± 6
0,098	92 ± 3	0,099	104 ± 3
0,198	71 ± 3	0,218	83 ± 2
0,297	67 ± 4	0,300	69 ± 2
0,400	58 ± 3	0,431	58 ± 1
0,497	52 ± 3	0,501	55 ± 1
0,605	49 ± 3	0,601	51 ± 1
0,692	44 ± 1	0,691	49 ± 1
0,809	40 ± 2	0,805	46 ± 1
0,891	43 ± 4	0,872	43 ± 1
1,021	39 ± 2	1,019	41 ± 1

Tabela 2.3. Ponto de fulgor para amostra de biodiesel de girassol e sebo bovino após adição de quantidades conhecidas de metanol. Os valores de ponto de fulgor são as médias de três determinações independentes.

Biodiesel Metílico (girassol)		Biodiesel Metílico (sebo bovino)	
Metanol adicionado % m/m	Ponto de fulgor °C ± DP	Metanol adicionado % m/m	Ponto de fulgor °C ± DP
0,000	156 ± 6	0,000	174 ± 2
0,104	97 ± 2	0,100	109 ± 7
0,200	73 ± 3	0,202	87 ± 2
0,308	63 ± 2	0,311	65 ± 4
0,397	52 ± 2	0,385	58 ± 3
0,500	47 ± 1	0,511	48 ± 1
0,600	46 ± 3	0,599	43 ± 1
0,709	40 ± 2	0,729	39 ± 2
0,828	37 ± 1	0,796	36 ± 1
0,900	35 ± 1	0,892	35 ± 1
1,006	32 ± 1	0,999	33 ± 1

Observa-se nos dados das Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3, que a temperatura do ponto de fulgor depende fortemente do teor de álcool residual. Considerando os limites estabelecidos pela ASTM D6751, EN 14110 e ANP 14/2012 para ponto de

fulgor (ASTM D 93, 130 °C; EN ISO 3679, 120 °C; NBR 14598, 100 °C) e para o teor de álcool residual (EN ISO 14110, 0,2 % m/m; NBR 15343 0,2 % m/m) um conflito é observado, pois nestas concentrações de metanol ou etanol, o ponto de fulgor diminui para valores, em torno de 71 °C a 87 °C, ou seja, abaixo do que estabelece a própria norma. Por outro lado, em comparação, o ponto de fulgor dos óleos diesel de uso rodoviário é fixado pela ANP através da resolução n° 65/2011 e deve apresentar um valor de no mínimo 38 °C, sendo, portanto, muito mais baixo do que os limites estabelecidos para o biodiesel. Sem dúvida temos aí situações contraditórias: i) exige-se ponto de fulgor mais alto para o biodiesel do que para o diesel; ii) esta contradição fica maior quando se lembra que o biodiesel é usado, pelo menos atualmente, em quantidades relativamente pequenas misturado ao diesel.

Dessa forma, no que diz respeito ao teor de álcool residual no biodiesel, concentrações em torno de 0,7 % poderiam ser aceitas, pois nestes casos observa-se uma temperatura de ponto de fulgor de 39 °C, temperatura esta similar a do diesel mineral. Uma mudança simples no teor de metanol ou etanol permitido certamente levará a um menor custo de produção e menores conseqüências ambientais, uma vez que o processo industrial seria simplificado e teria seu tempo de produção reduzido, consumindo menos energia e menos água para lavagem, gerando níveis mais baixos de efluentes líquidos.

A Figura 2.2 representa graficamente os dados das Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3. A correlação entre o ponto de fulgor e o teor de álcool residual é muito clara. Baseando-se nesta observação, um método pode ser proposto para a determinação de ambos os parâmetros, a temperatura do ponto de fulgor e o teor de álcool em biodiesel. Atualmente, as normas (EN ISO 14110 e ABNT NBR 15343) especificam tais análises por cromatografia a gás. Entretanto, a partir dos dados aqui apresentados, é evidente que a determinação do ponto de fulgor pelos métodos ASTM D6751 (130 °C), EN 14214 (120 °C) e ANP 14/2012 (100°C) já informam o teor de álcool residual, sendo portanto, desnecessário a análise por cromatografia. Além disso, o limite máximo regulamentado para o teor de álcool residual (0,2 % m/m) não está em concordância com os limites de ponto de fulgor

estabelecidos pelas normas. Para se estabelecer um acordo entre ponto de fulgor e álcool residual, a concentração de álcool não deveria ser maior do que 0,1 % m/m ou a temperatura de ponto de fulgor não poderia ser fixada acima de 70 °C.

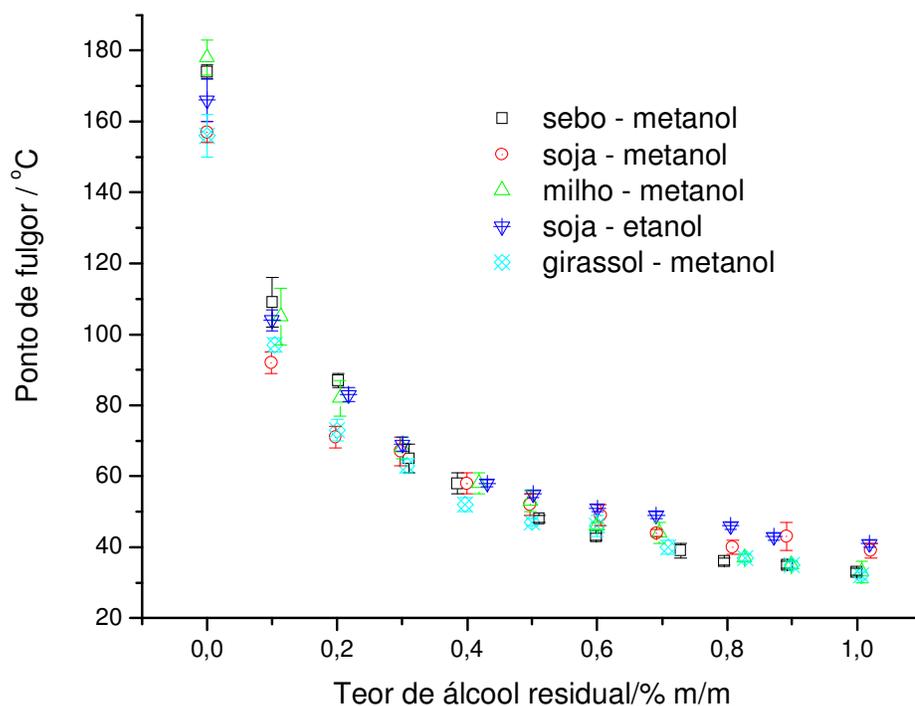


Figura 2.2. Dependência do ponto de fulgor do biodiesel no teor de álcool residual.

Em termos de toxicidade, é muito interessante comparar os limites regulamentados para metanol e etanol em destilados alcoólicos com aqueles do biodiesel. Por exemplo, o limite máximo de metanol conforme a legislação brasileira (Decreto n° 2314) é de 2000 mg L⁻¹ (0,1 % m/m para um litro de bebida contendo 40 % de etanol) do correspondente etanol anidro, para cachaça, whiskies e outros destilados de cereais é de 4000 mg L⁻¹ (0,2 % m/m para um litro de bebida contendo 40 % de etanol) para conhaques e destilados de frutas. A Legislação americana (Paini, 2001) estabelece um limite de metanol de 0,4 % m/m para um litro de bebida contendo 40 % de etanol.

Os limites anteriormente citados mostram claramente que as normas para o teor de álcool em biodiesel são mais rigorosas do que aquelas para bebidas. Em termos de cuidados toxicológicos pode ser considerado um exagero, principalmente no caso do etanol. E em relação à segurança no processo de estocagem e uso, o diesel mineral tem ponto de fulgor mais baixo do que os limites estabelecidos para o biodiesel. A gasolina tem ponto de fulgor abaixo de 0 °C e o etanol tem ponto de fulgor em torno de 13 °C e ambos são usados atualmente como combustível (Shepherd e Perez, 2008).

Os resultados deste estudo já foram publicados em:

Boog, J.H.F.; Silveira, E.L.C.; Caland, L.B.; Tubino, M. Determining the residual alcohol in biodiesel through its flash point. *Fuel* **2011**, 90, 905.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Os resultados das medidas de ponto de fulgor indicaram uma correlação deste parâmetro com o teor de álcool residual do biodiesel. Isto significa que a temperatura de ponto de fulgor determinada experimentalmente também informa a concentração de metanol ou etanol do biodiesel. Esta última análise atualmente é realizada por cromatografia a gás, um procedimento muito mais caro e trabalhoso. Em face ao exposto, uma revisão das regulamentações relacionadas ao teor de álcool residual e o ponto de fulgor pode ser proposta. Uma sugestão seria um ponto de fulgor ao redor de 39 °C, o que corresponderia a 0,7 % m/m do teor de álcool residual. O estabelecimento de tais limites certamente simplificaria o processo de produção de biodiesel, podendo diminuir os preços do produto. Também, traria benefícios no que diz respeito aos aspectos ambientais, relacionados com economia de energia e de água e pela diminuição do volume de líquidos efluentes.

***Capítulo 3: Determinação de fósforo em biodiesel
por espectrofotometria de absorção molecular***

1. OBJETIVO

O objetivo do trabalho descrito neste capítulo foi o desenvolvimento de um método para a determinação de fósforo em biodiesel por espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis baseado na reação de formação do complexo azul de molibdênio, empregando calcinação via seca no preparo da amostra.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica referente a este capítulo aborda os principais métodos analíticos encontrados na literatura para a determinação de fósforo em biodiesel e, além disso, trata ainda de alguns métodos analíticos envolvendo a formação do complexo azul de molibdênio para a determinação do teor de fósforo em diversas amostras.

2.1. Contaminantes inorgânicos em biodiesel

Do ponto de vista analítico, os cátions que devem ser monitorados em biodiesel são K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , além de P e S totais (resolução ANP 14/2012). A quantidade de cloreto, apesar de não ser normalizada também deveria ser monitorada, uma vez que ele está presente na matéria-prima e/ou pode ser introduzido no biodiesel durante a purificação através de lavagem com ácido clorídrico. Este procedimento de purificação empregando ácido é bastante utilizado em escala industrial.

A ANP estabelece um limite máximo de $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ para $Na + K$ e para $Ca + Mg$.¹ A presença dos cátions dos elementos sódio e potássio no biodiesel ocorre principalmente devido ao uso de catalisadores alcalinos na síntese do biodiesel. Por outro lado, os cátions cálcio e magnésio podem ser oriundos da matéria-prima

¹ Neste trabalho, ao longo do texto, serão usados os símbolos dos elementos químicos em lugar dos íons para fins de simplificação.

ou da água dura quando empregada na lavagem do biodiesel durante o processo de purificação (Knothe, 2006). É importante monitorar as quantidades destes elementos, pois a presença deles nos combustíveis pode ocasionar problemas mecânicos nos motores à combustão, comprometendo o funcionamento de pistões, bombas, injetores, câmara de combustão, etc. Segundo a ANP, as análises para a determinação desses cátions metálicos devem ser realizadas por espectrometria de absorção atômica - AAS (NBR 15554, NBR 15555, NBR 15556, EN 14108, EN 14109) ou por espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado – ICP OES (NBR 15553 e EN 14538). Em tais métodos é feita a diluição da amostra em solvente orgânico, como xileno, tolueno, querosene ou ciclohexano. Esses métodos são simples, no entanto, apresentam a desvantagem de empregar solventes tóxicos no preparo da amostra e, além disso, são necessários padrões organometálicos para a construção da curva analítica.

O teor de fósforo no biodiesel é proveniente da matéria-prima utilizada na produção, como fosfolipídios em óleo vegetal ou de gordura animal. A concentração máxima permitida pela ANP é de 10 mg kg^{-1} . Antes do processo de produção do biodiesel, o óleo ou gordura deve passar por um pré-tratamento denominado degomagem, para remoção de grande parte dos fosfolipídios. Neste procedimento são removidas também outras impurezas como ceras, substâncias coloidais e íons metálicos, através da lavagem do óleo (ou gordura) aquecido com água. A transesterificação de óleos vegetais brutos, ou seja, sem o tratamento prévio de degomagem, resulta na redução do rendimento da reação, bem como na produção de um biodiesel com alto teor de fósforo. Biodiesel com níveis elevados de fósforo podem ter como consequência a presença de materiais particulados em grande quantidade nas emissões gasosas dos motores. Além dos problemas ambientais diretos pela introdução destes poluentes, os mesmos poderão influenciar na operação de conversores catalíticos automotivo aumentando a problemática (Lôbo *et al.*, 2009). A norma brasileira (RANP 14/2012) estabelece os métodos analíticos EN ISO 14107 (ICP OES), NBR 15553 (ICP OES) e ASTM D 4951 (ICP OES) para a determinação de fósforo.

Assim como o fósforo, o enxofre também é um típico veneno de catalisadores e, portanto também afeta os conversores catalíticos. O biodiesel apresenta baixos níveis de enxofre, o que mostra que o biodiesel não afeta negativamente a catálise automotiva. A legislação brasileira, regulamenta um teor máximo de enxofre de 10 mg kg^{-1} e a determinação deste elemento pode ser realizada por espectrometria de fluorescência molecular (métodos EN ISO 20846, ASTM D 5453) ou por fluorescência de raios-X dispersivo de comprimento de onda (método ISO 20884).

2.2. Métodos analíticos para a determinação de fósforo e outros elementos em biodiesel

2.2.1. Métodos oficiais para a determinação de fósforo

Os métodos recomendados pela ANP para a determinação de fósforo são realizados por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A norma brasileira ABNT NBR 15553 especifica um método que permite a determinação dos teores de cálcio, magnésio, sódio, fósforo e potássio. A amostra deve ser diluída com xileno ou querosene, para permitir a introdução adequada do aerossol no plasma. As soluções de calibração são preparadas a partir de um composto orgânico de cálcio, magnésio, sódio, fósforo e potássio, dissolvido em óleo mineral e diluído numa mistura de xileno ou querosene e óleo-base. A adição do óleo-base, que é um fluido lubrificante que se obtém pela destilação do petróleo bruto, tem como objetivo reduzir as diferenças de viscosidade entre as amostras e as soluções de calibração.

O método ASTM D 4951 foi inicialmente desenvolvido para a determinação de bário, boro, cálcio, cobre, magnésio, fósforo, enxofre e zinco em óleos lubrificantes, mas também é aplicado para biodiesel e envolve análises por ICP OES. As amostras são diluídas em xileno ou outro solvente e é necessário o uso de padrões organometálicos, além de padrão interno. Os padrões internos

devem ser solúveis em óleo e alguns elementos são sugeridos, como por exemplo, Ag, Be, Cd, Co, La, Mn, Pb e Y.

Os procedimentos de preparo de amostra para os métodos oficiais são semelhantes. Os dois métodos empregam padrões organometálicos na construção da curva analítica e utilizam solventes orgânicos para diluição da amostra, exigindo assim, especial atenção na manipulação das soluções, como o uso de máscaras, de luvas além de capela. A principal diferença está na exigência do uso de padrão interno no método ASTM D 4951.

Os métodos oficiais, conforme já mencionado, recomendam a análise do biodiesel após uma diluição de 1:10 (m/v) com solvente orgânico empregando ICP OES. Este procedimento apresenta alguns inconvenientes, pois pode provocar a desestabilização ou extinção do plasma e a contaminação do equipamento, uma vez que o material carbonáceo não é reduzido pela diluição e alguns acessórios podem ser necessários para minimizar estes problemas, como por exemplo, nebulizador com injeção direta, nebulizador ultrassônico, entre outros (Korn, *et al.*, 2007). Além disso, a determinação de fósforo por ICP OES apresenta algumas limitações, em relação ao comprimento de onda a ser selecionado, pois as linhas de emissão do fósforo aparecem em comprimentos de onda abaixo de 180 nm, fazendo-se necessário o uso de um espectrômetro a vácuo.

Devido às desvantagens apresentadas pelos métodos oficiais, nos últimos anos muitos pesquisadores têm se dedicado ao desenvolvimento de novos métodos analíticos para a determinação de fósforo e outros elementos em biodiesel. Aqui serão descritos os métodos disponíveis na literatura para a determinação de fósforo e outros elementos em biodiesel de acordo com a técnica empregada para a detecção.

2.2.2. Técnicas espectrométricas empregadas para a determinação de fósforo em biodiesel

Muitas técnicas analíticas têm sido descritas na literatura para a determinação de contaminantes inorgânicos em biodiesel. No trabalho de revisão

de Lepri *et al.* (2011) são descritos diferentes procedimentos de preparo de amostra para a determinação de elementos traço em óleos vegetais e em biodiesel por técnicas espectrométricas atômicas. Entre os procedimentos destacam-se a decomposição da amostra via calcinação seca, decomposição por via úmida, análise direta, diluição da amostra, emulsificação, microemulsificação e extração. Na literatura, a maioria dos métodos para a determinação de fósforo em biodiesel foca em pequenas modificações dos métodos envolvendo ICP OES. Um procedimento para a determinação de Ca, P, Mg, K, Na e também Cl em biodiesel por ICP OES consistindo da dissolução das amostras e padrões organometálicos em querosene, foi descrito por Edlund *et al.* (2002). Os autores observaram que a adição de oxigênio ao gás nebulizador (argônio) possibilitou uma diminuição do material carbonáceo, aumentando a estabilidade do plasma. A principal vantagem desse procedimento é que o uso da mistura de gases oxigênio/argônio reduziu alguns efeitos provocados pela introdução de solventes orgânicos no plasma, melhorando assim, a sensibilidade do método.

Souza *et al.* (2008) realizaram a determinação simultânea de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na e P em biodiesel por ICP OES com visão axial e radial. As amostras foram preparadas pela formação de emulsão misturando-se ácido nítrico concentrado e Triton X-100 às amostras de biodiesel. Soluções padrão aquosas contendo Triton X-100 foram utilizadas na construção da curva analítica e ítrio foi empregado como padrão interno. Os melhores limites de quantificação foram obtidos com a configuração axial para Fe, Mg, Mn, Na e P, enquanto a configuração radial apresentou melhores resultados somente para Cu. No entanto, o elemento cálcio apresentou limites de quantificação similares nas duas configurações.

O método proposto por Santos *et al.* (2007) emprega etanol para dissolver a amostra e ítrio como padrão interno para compensar interferências de transporte. Com o procedimento proposto foi possível determinar os teores de Ca, P, Mg, K e Na em biodiesel de óleo de soja, mamona, algodão e gordura animal. O limite de detecção obtido para fósforo foi $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$. O trabalho de Chaves, *et al.* (2011), trata da determinação simultânea de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, S e Zn

em biodiesel e óleo vegetal. As amostras foram preparadas com adição de ácido nítrico concentrado e ítrio foi usado como padrão interno. A seguir foram diluídas com propanol e analisadas por ICP OES. As linhas de emissão selecionadas se situam entre 130 e 770 nm. Os dois métodos propostos envolvendo a dissolução da amostra em etanol ou propanol, oferecem algumas vantagens em relação ao método oficial, uma vez que dispensam o uso de solventes tóxicos ou padrões organometálicos para construção da curva analítica e além disso apresentam suficiente rapidez, sendo, portanto, adequados para análises de biodiesel ou óleos vegetais.

Além dos métodos já descritos por ICP OES com diluição da amostra em álcool, xileno ou por preparo de emulsão, têm se encontrado na literatura o emprego da digestão por forno microondas no preparo de amostras de biodiesel. No trabalho proposto por Korn *et al* (2010), utilizou-se um forno de microondas com cavidade para a digestão de amostras de biodiesel de diferentes fontes com adição de uma mistura contendo ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. A determinação de Ca, P, Mg, K e Na foi realizada por ICP OES. Os resultados obtidos para o biodiesel de mamona, soja e palma através do procedimento de digestão por aquecimento assistido por radiação microondas apresentou percentuais de recuperação de 89,0 - 103,0 % e quando comparados com àqueles obtidos por sistema aberto com aquecimento convencional não apresentaram diferenças significativas a um nível de confiança de 95 %, confirmando a exatidão do método.

O procedimento de digestão por forno microondas apresenta vantagens, é mais rápido, pouco reagente é necessário, no entanto, o custo instrumental é maior. De uma forma geral, os dois procedimentos de preparo de amostra e análise por ICP OES apresentam a vantagem de não empregar soluções padrão orgânicas para a calibração, não utilizam solventes orgânicos e não requerem acessórios especiais para introdução da amostra.

A técnica espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) também tem sido citada para a determinação de fósforo. No trabalho de Woods e Fryer (2007), amostras de biodiesel foram diluídas com querosene e

analisadas diretamente por ICP-MS equipado com um sistema de reação octopolo. O método permite a análise direta do biodiesel e a determinação simultânea de vários elementos (Be, B, Na, Mg, Si, P, S, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Sr, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, Ba, W, Hg e Pb). Enquanto ICP OES e AAS são técnicas empregadas para determinar uma quantidade limitada de elementos, ICP-MS oferece maior desempenho analítico e abrange uma faixa maior de elementos quando comparado a estas duas técnicas.

Além dos métodos envolvendo ICP OES e ICP-MS muitas outras técnicas vêm sendo empregadas no desenvolvimento de métodos para a determinação de fósforo em biodiesel. A espectrometria de absorção atômica com atomização por forno de grafite (GFAAS) tem se destacado e alguns dos métodos encontrados na literatura serão descritos a seguir.

Lyra *et al.* (2009) desenvolveram um método para a determinação direta de fósforo em biodiesel por espectrometria de absorção atômica com atomização por forno de grafite (GFAAS). O método permite a análise direta do biodiesel empregando um acessório de amostragem sólida. As temperaturas das etapas de pirólise e atomização e a massa de paládio empregada como modificador foram otimizadas por análise multivariada. As melhores condições obtidas foram 1300 °C e 2700 °C para as temperaturas de pirólise e atomização, respectivamente e massa igual a 30 µg do modificador paládio. A exatidão do método foi avaliada através da análise de materiais de referência (ASTM BIOD0804 e ASTM LU0801) e por comparação das análises de amostras reais com o método EN 14107. O procedimento do método de referência consiste na diluição da amostra com xileno e análise por espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Após análise estatística, os dados não apresentaram diferenças significativas a um nível de confiança de 95 % entre os resultados obtidos pelo método proposto e os procedimentos comparativos. O limite de detecção do método é de 1,2 mg kg⁻¹.

Outro trabalho envolvendo GFAAS foi recentemente proposto por Campos *et al.* (2011). Neste trabalho, o método proposto também possibilita a análise direta da amostra de biodiesel, sem a necessidade de qualquer pré-tratamento da

amostra. Alguns parâmetros foram otimizados e observou-se que a composição do modificador que forneceu melhores resultados foi Pd (0,15 % m/v) e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (0,10 % m/v) dissolvidos em 0,2 % v/v HNO_3 e 0,1 % v/v Triton X 100. A análise é realizada por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite com fonte contínua de alta resolução (HR-CS GFAAS).

Os dois métodos por GFAAS são muito interessantes, pois possibilitam a determinação de fósforo e de outros elementos que são regulamentados para biodiesel, como por exemplo, Na, K, Ca e Mg através de um único equipamento, uma vez que HR-CS AAS pode ser adquirido com os dois atomizadores, chama e forno de grafite. A técnica GFAAS também tem sido empregada para a determinação de outros elementos em biodiesel por diferentes procedimentos de preparo de amostra. Por exemplo, Cd, Pb e Tl baseando-se na formação de microemulsão sem o uso de surfactantes, empregando-se HNO_3 10 % v/v e n-propanol para formar a emulsão (Silva *et al.*, 2010) e Ni e Cd após a formação de microemulsão com Triton X-100 e o uso de tungstênio como modificador químico (Lobo *et al.*, 2011). E também foi proposta a determinação de arsênio em óleos vegetais e biodiesel através de um procedimento simples, pela formação de uma micro-emulsão pela adição de propan-1-ol e ácido nítrico às amostras e emprego de paládio com modificador químico (Vieira *et al.*, 2009). A determinação de Al, Cu, Fe e Mn também tem sido reportada na literatura através de procedimentos que envolvem atomização eletrotérmica com fonte contínua de alta resolução (HR-CS ETAAS) (Quadros *et al.*, 2011).

2.2.3. Técnicas de separação analítica

As técnicas de separação analítica, como eletroforese capilar (Piovezan *et al.*, 2010; Nogueira e Lago, 2011) e cromatografia de íons (Caland *et al.*, 2011) também tem sido citadas como eficientes na determinação de elementos em biodiesel. Piovezan *et al.* (2010) propuseram o uso da técnica de eletroforese capilar para a determinação de cátions inorgânicos em biodiesel. O método é baseado em procedimentos de extração líquido-líquido. Aproximadamente 200 mg

de biodiesel foram colocadas em tubos de 2 mL. A seguir foram adicionados 200 μL de uma solução de cloreto de bário ($5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de bário) como padrão interno. Esta mistura foi agitada por 20 minutos e após centrifugação, 150 μL da solução aquosa foi analisada por eletroforese capilar. Uma solução 10 mmol L^{-1} de imidazol e ácido acético 40 mmol L^{-1} foi empregada como eletrólito de correção de fundo e a detecção foi realizada através de um detector ultravioleta. Os limites de detecção obtidos foram iguais a $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para Na, K, Ca e Mg.

Nogueira e Lago (2011) empregaram a técnica de eletroforese capilar com detecção por condutividade para a determinação dos cátions Ca, K, Mg e Na e também dos ânions sulfato, fosfato, formiato, acetato, propionato além do glicerol em biodiesel. As amostras foram preparadas por extração líquido-líquido. A extração foi mais eficiente quando empregou-se a solução do eletrólito de separação (ácido etanosulfônico e L-histidina) diluída dez vezes como solução extratora, com adição de $\text{LiCl } 200 \mu\text{mol L}^{-1}$. Quando se utilizou a solução do eletrólito na extração obteve-se melhores resultados devido a troca iônica entre os cátions do eletrólito (histidina) e os cátions inorgânicos da amostra. O método foi aplicado para quatro amostras de biodiesel e a concentração de todos os analitos encontrava-se dentro dos limites estabelecidos pela resolução ANP. O método empregando eletroforese capilar mostra-se viável, devido a sua simplicidade, versatilidade, além de ser uma técnica de baixo-custo. O método é rápido e apresenta limites de detecção bem abaixo dos limites estabelecidos para biodiesel.

No trabalho desenvolvido por Caland *et al.* (2011) amostras de biodiesel obtidas de diferentes matérias-primas foram analisadas por cromatografia de íons para a determinação da concentração dos cátions de íons metálicos de Na, K, Ca e Mg. As amostras foram preparadas por extração líquido-líquido empregando 20 mL de água desionizada e 50 μL de solução de ácido nítrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ como solução extratora. O método apresentou uma boa exatidão, que foi avaliada através de testes de recuperação e comparação com o método de referência (ICP OES). Além disso, apresenta a vantagem de não empregar solvente orgânico no preparo da amostra e a técnica de cromatografia de íons apresenta custos de

aquisição e manutenção muito mais baixos do que um equipamento de ICP OES. Dessa forma, a cromatografia de íons mostrou-se uma técnica altamente viável para a determinação simultânea de Na, K, Ca e Mg em biodiesel.

2.2.4. Técnicas eletroanalíticas

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura para a determinação de analitos em biodiesel envolve técnicas espectrométricas como vimos anteriormente, e o emprego de técnicas de separação analítica também já estão sendo estudados. Além das técnicas já citadas, as técnicas eletroanalíticas também apresentam eficiência na determinação de fósforo em biodiesel, conforme os trabalhos propostos por Torrezani *et al.* (2011) e Zezza *et al.* (2012).

No trabalho de Torrezani *et al.* (2011), um eletrodo de carbono vítreo e um eletrodo quimicamente modificado com hexacianoferrato de ferro foram desenvolvidos para a determinação de fosfato por voltametria de onda quadrada e de pulso diferencial. A amostra de biodiesel foi adicionada à solução de eletrólito suporte e submetida à agitação. Em seguida, a fase aquosa foi separada e eluída em cartucho C 18 para a remoção de contaminantes e assim evitar interferência no método eletroquímico. O extrato foi usado na obtenção das medidas eletroquímicas. O limite de quantificação obtido empregando-se o eletrodo modificado foi de $3,97 \text{ mg kg}^{-1}$, um pouco abaixo do limite máximo especificado pelas normas, que é de $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$. O método voltamétrico mostrou-se adequado para a determinação de fósforo, na forma de fosfato em amostras de biodiesel, além de apresentar-se viável economicamente, pois não faz uso de reagentes caros e os equipamentos empregados também são de baixo-custo.

O método desenvolvido por Zezza *et al.* (2012) para a determinação de fósforo por voltametria cíclica, consiste no tratamento da amostra com ácido sulfúrico 1 mol L^{-1} para extração dos íons fosfato. O filme fosfomolibdico (PMo_{12}) 1:12 foi preparado para modificação do eletrodo de carbono vítreo. Amostras de biodiesel foram analisadas e pelo método de adição de padrão foi possível

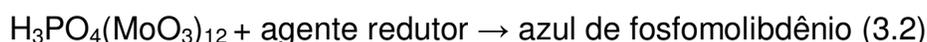
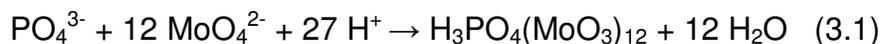
quantificar o teor de fósforo de $1,36 \pm 0,14 \text{ mg kg}^{-1}$. Os testes de recuperação comprovaram uma boa exatidão para o método, com valores entre 96 e 105 %.

Além das técnicas espectrométricas e eletroanalíticas já citadas neste trabalho, encontram-se na literatura trabalhos recentes, nos quais a espectrofotometria de absorção molecular tem sido empregada para a determinação de fósforo em biodiesel (Mendow *et al.*, 2011; Lira, *et al.*, 2011), além de Silveira *et al.* (2011) fruto da presente tese.

2.3. Métodos espectrofotométricos baseados na formação de complexo azul de molibdênio

Uma técnica muito interessante para a determinação de fósforo é a espectrofotometria de absorção molecular na região visível do espectro baseada na formação de complexo colorido azul de molibdênio. A reação de formação do complexo azul de molibdênio tem sido empregada na determinação de fósforo em diferentes tipos de amostras: óleo de canola (Szydłowska-Czerniak e Szlyk, 2003), carnes (Jastrzebska, 2009), águas (Worsfold, *et al.*, 2005; Kharat e Pagar, 2009; Lyddy-Meaney *et al.*, 2002) e plantas (Tubino e Torres, 1990).

A maioria dos métodos espectrofotométricos para a determinação de fósforo são baseados na reação do fosfato com molibdato em meio ácido produzindo fosfomolibdato, que é reduzido a um composto de coloração azul intenso, sendo determinado espectrofotometricamente. As equações 3.1 e 3.2 referem-se à formação do complexo azul de molibdênio (Worsfold *et al.*, 2005; Motomizu e Li, 2005).



Como mostrado na equação 3.2, o ácido molibdofosfórico (amarelo de molibdênio; Mo(VI)) é reduzido formando o complexo azul de molibdênio (Mo(V)). O complexo azul de molibdênio apresenta maior absorptividade molar do que o

amarelo de molibdênio. O comprimento de onda de máxima absorção se situa entre 650 e 850 nm, dependendo do redutor empregado. O complexo azul de molibdênio é formado em meio ácido e a redução do Mo(VI) depende da concentração de molibdato, do tipo de redutor, da concentração de fosfato e da concentração do ácido. Em condições de baixa acidez, podem ocorrer o desenvolvimento não-linear da cor e a auto-redução do molibdato (Worsfold *et al.*, 2005).

Agentes redutores como ácido ascórbico, cloreto de titânio II, sulfato de hidrazina e ácido 2-naftol-4-sulfônico são comumente empregados na reação de formação do complexo azul de molibdênio (Motomizu e Li, 2005; Worsfold *et al.*, 2005; Tubino e Torres, 1990). Recentemente Shila *et al.* (2011) propuseram o emprego de tiouréia como agente redutor para a determinação de fosfato em amostras de solos, detergentes e água. Além dos agentes redutores convencionais, o emprego da bactéria *Serratia marcescens* Strain Dr. Y9 na redução de molibdênio VI para azul de molibdênio também foi estudada por Yunus, *et al.* (2009).

2.3.1. Determinação de fósforo em óleos vegetais por espectrofotometria

As amostras são geralmente submetidas a um tratamento prévio antes de realizar a reação para formação do complexo, a depender do tipo de matriz. Alguns autores relatam o emprego de calcinação por via seca para mineralização da amostra em análise de óleos vegetais. No trabalho proposto por Szydłowska e Szlyk (2003), amostras de óleo de canola são calcinadas a uma temperatura de 800 °C, com adição de óxido de magnésio e as cinzas dissolvidas em ácido sulfúrico. A seguir, é realizada a reação para formação do complexo por três métodos, o método vanadomolibdato, azul de molibdênio e o verde malaquita. Os resultados obtidos com os três métodos espectrofotométricos não indicou diferenças significativas a um nível de confiança de 95 % em relação a exatidão e precisão. Coks e Van Rede (1966) propuseram um método semelhante para a

determinação de fósforo em lecitina de soja e também em óleos vegetais realizado em duas etapas, decomposição da matéria orgânica por calcinação por via seca e determinação de fósforo através da reação de formação do complexo azul de molibdênio.

Szydłowska (2007) sugere o emprego da espectroscopia na região do infravermelho médio (MIR) e análise por regressão dos mínimos quadrados parciais para a determinação de fosfolípidios em óleos de canola em diferentes etapas da produção. Os resultados obtidos por espectroscopia MIR são equivalentes àqueles obtidos através dos métodos espectrofotométricos verde malaquita e vanadomolibdato. O método empregando a espectroscopia MIR apresenta algumas vantagens, pois não é destrutivo, dispensa o uso de reagentes tóxicos e pode ser aplicado na indústria para monitoramento on line do teor de fosfolípidios em óleos vegetais.

2.3.2. Determinação de fósforo em biodiesel por espectrofotometria

Existem poucos trabalhos na literatura sobre a determinação de fósforo em biodiesel por métodos espectrofotométricos e esta foi a principal motivação para o desenvolvimento de um método aplicando a espectrofotometria de absorção molecular.

No trabalho proposto por Mendow *et al.* (2011) os pesquisadores analisaram biodiesel produzido a partir de óleo de soja não - degomado e observaram que a reação de transesterificação provoca uma transformação nos fosfolípidios inicialmente presentes no óleo bruto, levando a formação de compostos de fósforo muito solúveis nas fases polares, tais como a fase rica em glicerina e a fase aquosa usada no processo de neutralização e lavagem final.

Dessa forma, a lavagem do biodiesel, realizada para extrair impurezas como glicerina, metanol, sabões e catalisador, também remove o fósforo remanescente. Além disso, foi observado que a evaporação do metanol, na presença das duas fases após a reação de transesterificação, favoreceu ainda

mais a transferência dos fosfolipídios saponificados para a fase glicerol, pois quanto menor o teor de metanol em biodiesel, menor será a solubilidade dos fosfolipídios saponificados. Para o monitoramento do teor de fósforo no biodiesel, as amostras foram calcinadas e a cinza dissolvida em ácido clorídrico concentrado. Após, fez-se reagir a solução do biodiesel com molibdato de amônio empregando sulfato de hidrazina como agente redutor e as medidas de absorvância do complexo formado foram realizadas por espectrofotometria de absorção molecular. O método apresentou limite de detecção igual a $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$, o suficiente para a determinação de fósforo em biodiesel.

Lira *et al.* (2011) desenvolveram uma metodologia baseada em análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica (FIA-SD). As amostras foram digeridas em bloco de aquecimento usando uma mistura ácida ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$). Uma solução reagente mista preparada pela adição de ácido sulfúrico, molibdato de amônio e tartarato de potássio e antimônio foi empregada para promover a reação com o fósforo presente na amostra. Os resultados obtidos por FIA-SD foram similares àqueles obtidos pelo método oficial (ICP OES) e os testes de recuperação mostraram resultados entre 98,6 e 114,8 % para amostras de biodiesel de óleo de girassol, mamona e soja. Neste trabalho, os autores obtiveram limites de detecção e quantificação, iguais a $0,14 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,46 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente.

Neste contexto, o presente trabalho propõe um procedimento para determinação de fósforo em amostras de biodiesel por espectrofotometria de absorção molecular empregando decomposição por via seca para o preparo da amostra e formação do complexo azul de molibdênio após mineralização da amostra, empregando como agente redutor o ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos utilizados

- Balança analítica modelo AX 200, ($\pm 0,0001$ g) (Shimadzu,);
- Balança analítica modelo AX 205 DeltaRange®, ($\pm 0,00001$ g) (Mettler Toledo);
- Cromatógrafo de íons modelo 882 Compact IC (Metrohm);
- Digestor UV 705 Metrohm
- Espectrofotômetro UV/Visível, modelo Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech,;
- Estufa (Quimis);
- Mufla, (EDG equipamentos);
- Sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore);
- Vidrarias de uso rotineiro em laboratório.

3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) obtida de um sistema de purificação Milli-Q. Todos os reagentes empregados foram de grau analítico e são listados a seguir.

- Ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico, $\text{H}_2\text{NC}_{10}\text{H}_5(\text{OH})\text{SO}_3\text{H}$ (Sigma-Aldrich);
- Ácido sulfúrico, H_2SO_4 (Synth);
- Bicarbonato de sódio, NaHCO_3 (Vetec);
- Bissulfato de sódio, NaHSO_4 (Synth)
- Bissulfito de sódio, NaHSO_3 (Synth);
- Carbonato de sódio, Na_2CO_3 (Nuclear);
- Clorofórmio, CHCl_3 (Synth);
- Dihidrogenofosfato de potássio, KH_2PO_4 (Nuclear);
- Lecitina de soja purex (Inlab);

- Molibdato de amônio, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}4\text{H}_2\text{O}$ (Vetec);
- Óxido de magnésio MgO (Carlo Erba);
- Peróxido de hidrogênio (30%), H_2O_2 (Sigma-Aldrich);
- Solução padrão de 1000 mg L⁻¹ de fosfato (Sigma Aldrich).
- Sulfito de sódio (Na_2SO_3 , Nuclear);

3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Preparo das soluções empregadas na reação de formação do complexo azul de molibdênio

Dihidrogenofosfato de potássio foi empregado para preparar uma solução padrão estoque de fósforo (1000 mg L⁻¹). As soluções estoque foram armazenadas em frascos de polietileno sob refrigeração a 4 °C. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente pela diluição serial da solução estoque com água desionizada.

A solução de molibdato de amônio foi preparada pela dissolução de 12,5 g de molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}4\text{H}_2\text{O}$) em cerca de 100 mL de água desionizada e adição de 150 mL de ácido sulfúrico 5 mol L⁻¹. O volume foi completado para 500 mL com água desionizada. A solução foi estocada sob refrigeração em frasco de vidro âmbar.

A solução do agente redutor ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico foi preparada misturando-se 250 mg deste composto com 10 gotas de solução aquosa de bissulfito de sódio (NaHSO_3) 15 % em um béquer, formando uma pasta. Em seguida, foram adicionados 97,0 mL de uma solução aquosa de bissulfato de sódio (NaHSO_4) e 2,5 mL da solução de sulfito de sódio (Na_2SO_3) a 20 %. Deixou-se em repouso por cerca de 12 h, filtrou-se em papel de filtro quantitativo e por fim, a solução do agente redutor foi estocada em frasco de vidro âmbar.

3.3.2. Determinação do teor de fósforo no padrão de lecitina de soja

Antes da análise das amostras de biodiesel, analisou-se a lecitina de soja purex, para determinar a concentração de fósforo, de modo que esta pudesse ser, posteriormente, empregada como padrão nas análises de biodiesel. Procedeu-se a análise por espectrofotometria e também por cromatografia de íons.

O procedimento empregado para determinação do teor de fósforo em lecitina foi baseado no método proposto por Coks e Van Rede (1966). Aproximadamente 0,5 g de lecitina de soja purex foram pesados diretamente em cadinhos de quartzo de 80 mL numa balança analítica. 2,5 mL de CHCl_3 foram adicionados para dissolver a amostra, seguida pela adição de 2,0 g de MgO . A mistura foi aquecida a 110 °C durante 15 minutos em mufla para remover o clorofórmio. A seguir, a temperatura foi cuidadosamente aumentada para 800 °C e mantida neste nível por 2 h. Após resfriamento cuidadoso à temperatura ambiente, as cinzas foram dissolvidas diretamente no cadinho com pequenas porções de uma solução aquosa de H_2SO_4 1,0 mol L^{-1} (volume total 50,0 mL) e transferidas para um balão volumétrico de 100 mL. O cadinho foi lavado com pequenas porções de água desionizada e o volume do balão completado até a marca com água.

A reação analítica foi realizada transferindo-se uma alíquota (1,0 mL) da solução preparada da amostra para um balão volumétrico de 25,0 mL (determinação realizada em triplicata). Em cada balão foram adicionados 5,0 mL da solução de molibdato de amônio e a mistura foi cuidadosamente agitada. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL da solução do agente redutor completando-se o volume do balão volumétrico com água e deixou-se reagir durante 20 minutos. A absorvância do complexo formado foi medida no espectrofotômetro em 730 nm, empregando-se cubetas de caminho óptico de 1,0 cm.

3.3.3. Determinação do teor de fósforo em amostras de biodiesel

Inicialmente, foram realizados experimentos para verificar se eram obtidos resultados de recuperação similares quando se empregava a temperatura de 550 °C para a calcinação do biodiesel ao invés de 800 °C como indicada por Coks e Van Rede (1966). Os resultados confirmaram a suposição inicial e, portanto, a temperatura de 550 °C foi usada neste trabalho para o tratamento das amostras. Foram pesados aproximadamente 10 g de biodiesel numa balança analítica diretamente em cadinhos de quartzo. Em seguida, foram adicionados 0,5 g de óxido de magnésio. Após agitação com bastão de vidro a mistura foi submetida à calcinação em mufla. A temperatura foi lentamente aumentada em etapas até 550 °C (1 h a 100 °C, 1 h a 180 °C, 5 h a 250 °C, 1 h a 300 °C e 2 h a 550 °C) para evitar perda da amostra. Após cuidadoso resfriamento à temperatura ambiente as cinzas foram dissolvidas diretamente nos cadinhos com pequenas porções da solução aquosa de H₂SO₄ 1 mol L⁻¹ (volume total 25 mL) e transferidas para um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com água. Transferiu-se 18 mL desta solução para balão volumétrico de 25 mL onde foi realizada a reação analítica e a absorbância medida conforme descrito acima. O procedimento foi realizado em triplicata.

3.3.4. Determinação de fósforo no padrão lecitina de soja purex por cromatografia de íons

Foram pesados aproximadamente 0,00500 g de lecitina de soja em tubos de quartzo e adicionados 0,5 mL H₂O₂ 30 %. Esta mistura foi submetida à fotólise UV por 2 h em digestor UV 705 Metrohm, equipado com lâmpada de mercúrio de 500 W de alta pressão. A temperatura foi mantida a 85 ± 5 °C através de um sistema de resfriamento ar/água. Após a digestão a amostra foi resfriada e diluída a 10 mL com água desionizada e analisada por cromatografia de íons.

As análises cromatográficas de íons foram realizadas em cromatógrafo modelo 882 Compact IC (Metrohm) equipado com bomba isocrática. Uma solução

mista composta por Na_2CO_3 3,2 mmol L^{-1} e NaHCO_3 1,0 mmol L^{-1} foi usada como eluente, purgado em ultrasson durante 15 minutos para remoção dos gases dissolvidos (principalmente CO_2). As soluções padrão de fosfato foram preparadas através da diluição da solução padrão estoque de 1000 mg L^{-1} (Sigma Aldrich). O volume de injeção da amostra foi de 20 μL . Foi empregada uma coluna analítica Metrosep A Supp 5 (4 x 150 mm) a base de substrato polimérico funcionalizado com grupamentos de amônio quaternário. A detecção foi feita por um detector de condutividade. A condutividade do eluente foi suprimida através do supressor aniônico no modo de regeneração por auto-supressão com solução de H_2SO_4 100 mmol L^{-1} . A aquisição e tratamento de dados foram obtidos através do software MagicNet 2.0 (Metrohm).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação do teor de fósforo no padrão lecitina de soja

A fosfatidilcolina (FC) consiste de uma mistura de fosfolipídeos naturais constituídos por uma extremidade polar formada por um grupo colina e um grupo fosfato ligados à porção hidrofóbica, duas longas cadeias acílicas de 16 a 22 carbonos, por ligações ésteres com o glicerol, como pode ser visto na Figura 3.1.

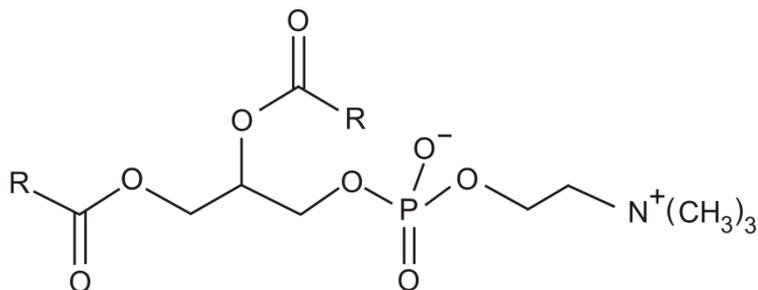


Figura 3.1. Estrutura molecular da fosfatidilcolina (FC), R representa longa cadeia hidrocarbonada que pode conter insaturações.

As cadeias acílicas podem conter uma ou mais insaturações. Devido à estrutura polar-apolar, ou seja, anfifílica, essas moléculas tendem a se auto-organizar em bicamadas com importantes funções biológicas, como por exemplo, as membranas celulares de organismos vivos (Mertins *et al.*, 2009). Em grau comercial, a lecitina de soja geralmente contém cerca de 2,2 % de fósforo (Merck Index, 1997).

A concentração de fósforo no padrão de lecitina de soja foi determinada por espectrofotometria e também por cromatografia de íons.

4.1.1. Comparação dos resultados obtidos por espectrofotometria e por cromatografia de íons.

Uma curva analítica foi construída utilizando o método de calibração externa com soluções aquosas de KH_2PO_4 , entre as concentrações de 2,0 e 10,0 mg L^{-1} de fósforo para a determinação de fósforo por espectrofotometria. O método apresentou uma boa linearidade, que foi avaliada através do coeficiente de correlação linear, $r= 0,99925$. A curva analítica pode ser expressa pela equação $A=0,02842 + 0,14029 C$, onde A é a absorbância medida a 730 nm e C é a concentração de fósforo na solução de KH_2PO_4 em mg L^{-1} .

A Figura 3.2. apresenta a curva analítica empregada para a determinação do teor de fósforo no padrão de lecitina de soja por espectrofotometria.

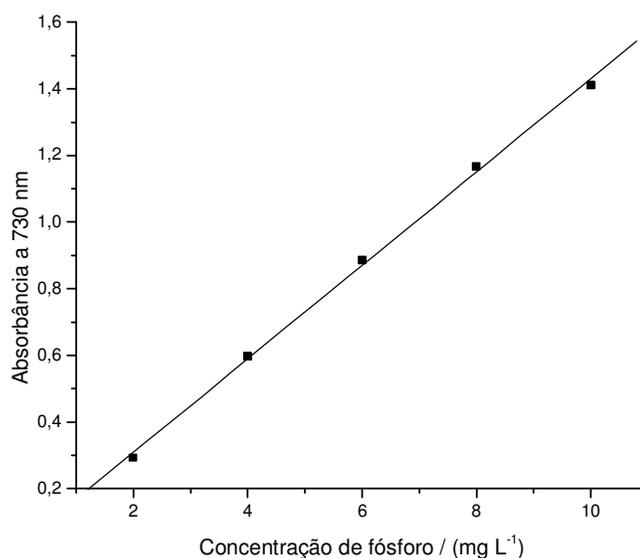


Figura 3.2. Curva analítica obtida a partir de soluções padrão de fósforo (KH_2PO_4) em concentrações de 2,0 a 10,0 mg L^{-1} . As medidas foram realizadas a 730 nm.

A Figura 3.3 ilustra um espectro de absorção molecular obtido para uma amostra de lecitina de soja.

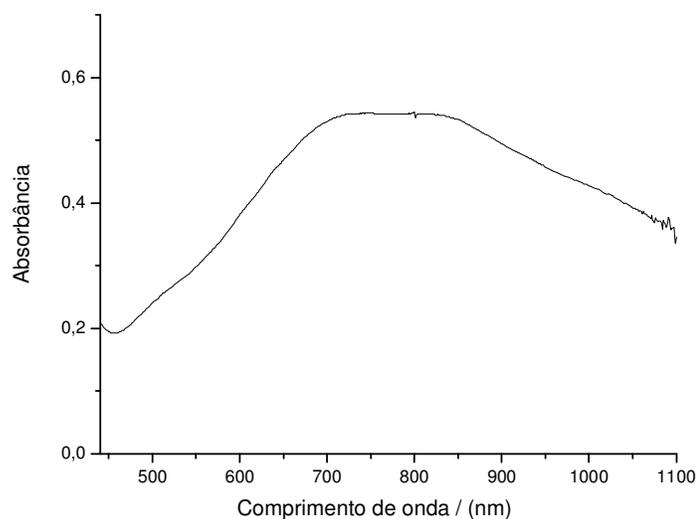


Figura 3.3. Espectro de absorção molecular para o complexo azul de molibdênio obtido a partir de uma amostra de lecitina de soja.

A curva analítica obtida para o método de cromatografia de íons pode ser expressa pela equação $A = -0,03046 + 0,04447 C$ e está ilustrada na Figura 3.4. O coeficiente de correlação linear, foi de $r = 0,9993$.

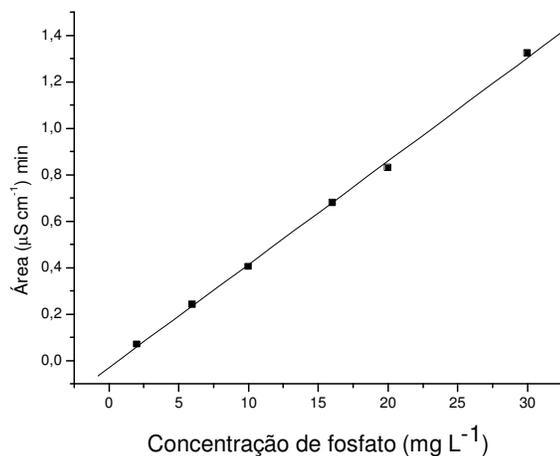


Figura 3.4. Curva analítica obtida a partir de soluções-padrão de fosfato em concentrações de 2,0 a 30,0 mg L⁻¹.

O cromatograma obtido para a lecitina de soja após digestão por radiação ultravioleta é apresentado na Figura 3.5.

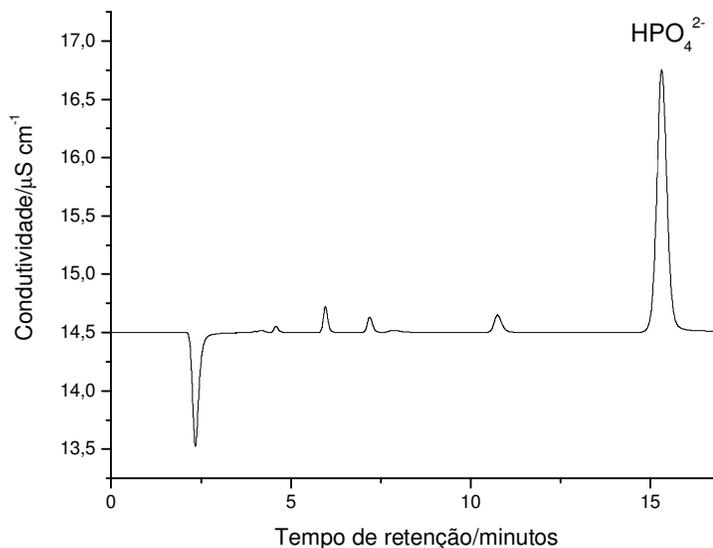


Figura 3.5. *Cromatograma obtido para uma solução de lecitina de soja após digestão por radiação ultravioleta.*

Com o objetivo de verificar a equivalência em termos de exatidão e precisão dos métodos espectrofotométrico e cromatográfico, fez-se uma comparação estatística usando o test-t pareado e o teste-F. Os resultados obtidos para o teor de fósforo em lecitina de soja e as comparações estatísticas entre os dois métodos são mostrados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Comparação entre os valores obtidos por espectrofotometria e cromatografia de íons para o teor de fósforo em lecitina de soja usando teste-t de Student e o teste-F de Snedecor. Para $\alpha = 0,05$, valor do t crítico = 4,30 e o valor do F crítico = 19,00 ($n=3$).

Espectrofotometria			Cromatografia de íons			Teste estatístico	
Conc. (mg g ⁻¹)	DP	DPR (%)	Conc. (mg g ⁻¹)	DP	DPR (%)	t _{cal}	F _{cal}
21,59	0,25	1,16	22,77	0,32	1,41	4,27	1,64

A exatidão dos métodos foi comparada através do teste t pareado (Skoog, 2006; INMETRO, 2003).

Observa-se na Tabela 3.1 que $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$, indicando que não há diferença significativa a um nível de confiança de 95 % em relação à exatidão dos resultados obtidos por ambos os métodos.

A diferença na precisão entre os resultados obtidos pelos dois métodos foi avaliada aplicando o teste F. O teste é baseado na comparação entre as variâncias das medidas (S^2_A/S^2_B) e realizado através de comparações entre o valor de $F_{\text{calculado}}$ e o $F_{\text{crítico}}$. Quando $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, a hipótese nula não pode ser aceita (Skoog *et al.*, 2006). O valor de F calculado, mostrado na Tabela 3.1. indica que os dois métodos não apresentam diferenças significativas em relação à precisão.

A exatidão do método também pode ser avaliada através da comparação dos resultados obtidos com um valor de referência, aplicando o teste-t de Student. Em grau comercial, a lecitina de soja geralmente contém cerca de 2,2 % de fósforo (Merck Index, 1997) e este valor foi considerado como referência.

Os resultados obtidos pelos dois métodos não apresentam diferenças significativas a um nível de confiança de 95 %, entre nenhum dos dois métodos e o valor de referência, pois $t_{\text{cal}} < t_{\text{crit}}$.

Os resultados da comparação estatística entre os métodos e o valor de referência são mostrados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. *Comparação entre os resultados obtidos e o valor de referência (2,2 %) para o teor de fósforo em lecitina de soja comercial.*

Método	Conc. (%)	DP	t _{cal}
Espectrofotométrico	2,16	0,025	3,03
Cromatografia de íons	2,28	0,03	3,78

Os testes estatísticos mostraram que os resultados obtidos através do método espectrofotométrico e também por cromatografia de íons para o teor de fósforo na amostra de lecitina de soja comercial são equivalentes entre si e concordantes com o valor de referência. Dessa forma, os dois métodos aqui descritos podem ser empregados para a determinação de fósforo em lecitina de soja, tornando-se uma boa alternativa para o controle de qualidade da lecitina comercial.

Os resultados obtidos indicaram ser adequado o uso da lecitina de soja como padrão de fósforo para avaliar a exatidão do método para as análises de biodiesel.

4.2. Validação do método para análise de biodiesel

O método desenvolvido empregando espectrofotometria de absorção molecular foi validado em termos da linearidade, sensibilidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

4.2.1. Linearidade

A curva analítica foi construída utilizando o método de calibração externa com soluções aquosas de KH_2PO_4 , entre as concentrações de 0,5 e 2,5 mg L^{-1} de fósforo. Obteve-se uma boa linearidade, avaliada através do coeficiente de correlação linear, $r= 0,9996$. A curva analítica pode ser expressa pela equação $A=0,0019 + 0,145 C$, onde A é a absorbância medida a 730 nm e C é a concentração de fósforo na solução de KH_2PO_4 em mg L^{-1} . Os espectros de

absorção molecular obtidos para a construção da curva analítica são apresentados na Figura 3.6.

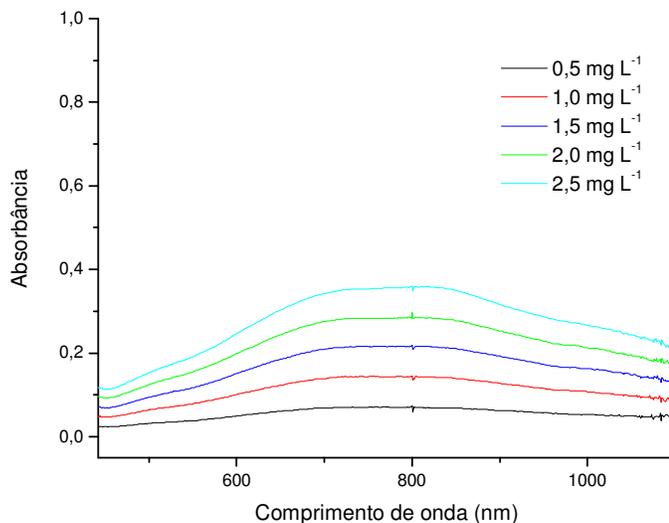


Figura 3.6. Espectros de absorção molecular obtidos para padrões de fósforo em concentrações de 0,5 a 2,5 mg L⁻¹.

A curva analítica obtida para os padrões de fósforo está mostrada na Figura 3.7.

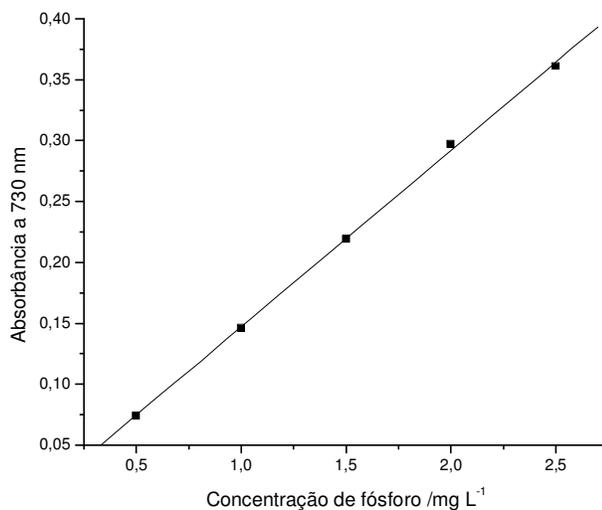


Figura 3.7. Curva analítica obtida a partir dos espectros de absorção molecular de padrões de fósforo em concentrações variando de 0,5 a 2,5 mg L⁻¹.

4.2.2. Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, enquanto o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida utilizando um determinado procedimento experimental (Ribani *et al.*, 2004).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados considerando $LD = 3,3 S/b$ e $LQ = 10 S/b$, onde “S” corresponde à estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão e “b” é a inclinação da curva analítica (Ribani *et al.*, 2004; INMETRO, 2010). Os valores dos limites de detecção e de quantificação obtidos foram $0,57 \text{ mg kg}^{-1}$ e $1,71 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. Esses resultados demonstram que o método é adequado para detectar e quantificar os níveis de concentração de fósforo em biodiesel, uma vez que são menores que o limite máximo permitido pela ANP, que é de 10 mg kg^{-1} (RANP 14/2012). Além disso, os limites de detecção e quantificação do método proposto também são menores que aqueles obtidos por Mendow *et al.* (2011), que também desenvolveram um método por espectrofotometria de absorção molecular para determinação de fósforo em biodiesel.

4.2.3. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em concentrações definidas. As três formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade e é geralmente apresentada em termos de desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR) (Ribani, *et al.*, 2004; INMETRO, 2010). Neste trabalho, a repetibilidade foi avaliada através da realização de ensaios em triplicata e os valores expressos em termos de DP e DPR.

4.2.4. Exatidão

A exatidão do método proposto foi avaliada através de testes de recuperação, devido a ausência de materiais de referência certificados para biodiesel. Experimentos de recuperação apresentam uma limitação intrínseca que está relacionada com a forma do analito usada para fortificar a amostra. Esta forma não é sempre idêntica aquela presente naturalmente na matriz e isso pode implicar, por exemplo, no uso de substâncias que levam a uma falsa recuperação, ocasionando avaliações excessivamente otimistas do processo de recuperação (INMETRO, 2010). Considerando esta limitação, lecitina de soja purex, analisada em nosso laboratório, contendo $2,23 \pm 0,08$ % m/m de fósforo foi usada como padrão de fósforo, uma vez que os fosfolipídios são a principal fonte de fósforo em óleos e gorduras.

As amostras foram fortificadas com o padrão de fósforo em três níveis de concentração. Sendo assim, o cálculo da recuperação foi efetuado segundo a equação 3.3.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (3.3)$$

Sendo que:

C_1 representa a concentração determinada na amostra adicionada;

C_2 representa a concentração determinada na amostra não-adicionada;

C_3 representa a concentração adicionada.

4.3. Aperfeiçoamento do procedimento de calcinação da amostra

A decomposição por via seca em mufla é um dos procedimentos mais simples para o tratamento de amostras. O procedimento baseia-se na queima da fração orgânica da amostra com o oxigênio do ar, obtendo-se um resíduo inorgânico, na forma de cinza, solúvel em ácido diluído. A amostra é colocada em um cadinho e aquecida até que todo o material orgânico seja queimado, resultando apenas um resíduo inorgânico não volátil.

As principais desvantagens da calcinação via seca são o risco de contaminação, perda do analito pela formação de compostos voláteis e perda da amostra por projeção ou ignição. Alguns aditivos podem ser adicionados às amostras em decomposições por via seca para acelerar a oxidação, prevenir a volatilização de certos componentes das cinzas ou prevenir reações entre os componentes da cinza e o material do cadinho (Krug *et al.*, 2010).

Neste trabalho, empregou-se óxido de magnésio com o objetivo de evitar perdas do íon fosfato por volatilização.

Ensaio preliminares foram realizados com amostras de biodiesel de milho fortificadas com adição de 13,14 mg kg⁻¹ de fósforo e seguiu-se o procedimento de preparo de amostra descrito na parte experimental, empregando cadinhos de porcelana. Os resultados obtidos mostraram uma recuperação de apenas 73,13 % (DPR = 3,26 %), o que indicou que a exatidão do método deveria ser melhorada. Decidiu-se então, substituir os cadinhos de porcelana por cadinhos de quartzo, já que os fosfatos combinam-se facilmente com o esmalte dos cadinhos de porcelana. Foram novamente analisadas as amostras de biodiesel de milho e obteve-se uma recuperação de 88,01 % (DPR = 6,19 %). Dessa forma, pode-se inferir que o emprego de cadinhos de quartzo contribuiu para uma melhor recuperação do analito.

Além do emprego de cadinhos de quartzo, outros cuidados foram necessários, como a relação entre a quantidade máxima de amostra/tamanho do cadinho para evitar perda de amostra durante o aquecimento além do emprego de aquecimento gradual (rampa de aquecimento). Após alguns testes, foi observado

que ocorria perda da amostra durante o aquecimento; percebeu-se que ao atingir rapidamente a temperatura de 300 °C ocorria perda da amostra por projeção para fora do cadinho. Então, aumentou-se o tempo de permanência em temperaturas mais baixas e o seguinte programa de aumento gradual da temperatura foi empregado para as análises: 1 h a 100 °C, 1 h a 180 °C, 5 h a 250 °C, 1 h a 300 °C e 2 h a 550 °C, com 10 g de amostra e um cadinho de quartzo de 80 mL para evitar perda da amostra por ejeção durante a ebulição.

Aperfeiçoadas estas condições, o método foi aplicado para análise de amostras de biodiesel.

4.4. Análise de amostras de biodiesel

O método proposto foi aplicado para análise de amostras de biodiesel sintetizadas no próprio laboratório (biodiesel de sebo bovino, canola e girassol) e fornecido por uma indústria (biodiesel de óleo de soja bruto).

A Figura 3.8. mostra um espectro obtido para o complexo azul de molibdênio para uma amostra de biodiesel de sebo bovino, com teor de fósforo de 12,11 mg kg⁻¹.

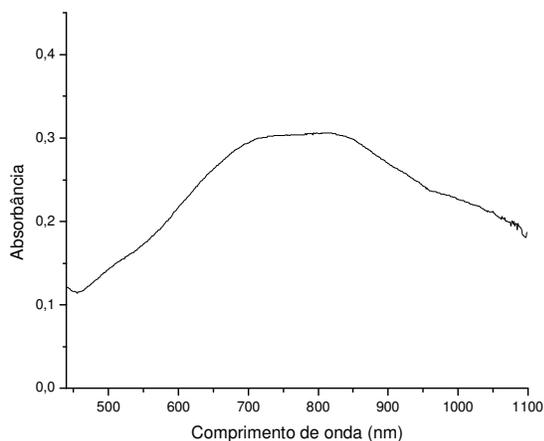


Figura 3.8. Espectro de absorção molecular para o complexo azul de molibdênio obtido a partir de uma amostra de biodiesel de sebo bovino (12,11 mg kg⁻¹ de fósforo).

A exatidão do método foi determinada por meio da obtenção da porcentagem de recuperação avaliada em três níveis de concentração, em triplicata. Para isso, as amostras de biodiesel foram fortificadas com quantidades conhecidas de fósforo na forma de lecitina de soja. Os resultados são mostrados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. *Recuperação do teor de fósforo adicionado às amostras de biodiesel na forma de lecitina de soja.*

Biodiesel	Concentração de fósforo / mg kg ⁻¹			Recuperação / %	±DP / %	DPR %
	Adicionada	Esperada	Encontrada			
Soja	0	-	1,87±0,17	-	-	-
	2,7500	4,62	4,72	103,6	4,6	4,5
	5,0099	6,88	6,16	85,5	2,3	2,7
	10,1633	12,03	11,55	95,3	2,0	2,1
			Média	94,8	-	3,1
Canola	0	-	< LQ	-	-	-
	3,6800	3,68	4,22	114,7	2,9	2,5
	5,0251	5,03	5,55	110,5	8,4	7,6
	11,7295	11,73	12,37	105,5	4,2	4,0
			Média	110,2	-	4,7
Sebo bovino 550 °C	0	-	1,90±0,18	-	-	-
	3,1564	5,06	5,64	118,1	6,2	5,2
	5,6470	7,55	7,25	94,6	2,7	2,8
	11,1143	13,01	11,47	86,1	4,6	5,4
			Média	99,6	-	4,5
Sebo bovino 800 °C	0	-	1,90±0,18	-	-	-
	11,1659	13,07	11,54	86,3	5,3	6,2
Girassol	0	-	<LQ	-	-	-
	2,7260	2,73	2,89	105,9	8,7	8,2
	5,5711	5,57	5,43	97,5	4,4	4,5
	10,9902	10,99	9,93	90,4	2,4	2,7
			Média	97,9	-	5,1
Média Geral				100,7	-	4,5

Pode ser observado, na Tabela 3.3, que independentemente da temperatura de calcinação, 550 °C ou 800 °C, a quantidade de fósforo encontrada no biodiesel de sebo bovino foi a mesma. Estes resultados confirmam a

adequação da menor temperatura usada, ao contrário daquela sugerida na literatura.

Os resultados obtidos mostram valores de recuperação entre 85,5 % e 118,1 %, com uma média geral de 100,7 %. O desvio padrão relativo médio geral observado foi 4,5 %. Em muitos procedimentos analíticos, intervalos de recuperação na faixa de 70-120% com precisão de até $\pm 20\%$ são geralmente aceitos. Entretanto, dependendo da complexidade analítica e da amostra, esta faixa pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (Ribani et al., 2004). Dessa forma, os resultados mostrados neste trabalho indicam que o método proposto tem uma boa exatidão e precisão para a determinação de fósforo em amostras de biodiesel.

É importante lembrar que o fósforo presente no biodiesel é proveniente dos fosfolípidos encontrados tanto nos óleos vegetais como em gordura animal. Estes lípidos são geralmente removidos por um processo conhecido como degomagem, com a conseqüente remoção de fósforo. Dessa forma, a presença deste elemento não é esperada em óleos e gorduras degomados, a não ser em concentrações muito baixas, como foi observado nas amostras de biodiesel de óleos de canola e girassol.

A concentrações de fósforo nas amostras de biodiesel estudadas foi de $1,90 \pm 0,18 \text{ mg kg}^{-1}$ para sebo bovino e $1,87 \pm 0,17 \text{ mg kg}^{-1}$ para o biodiesel preparado do óleo de soja bruto. As amostras de biodiesel de canola e girassol apresentaram valores abaixo do limite de quantificação do método.

O procedimento de calcinação em mufla mostrou-se eficiente para a análise de biodiesel, embora na literatura conste apenas um trabalho empregando a calcinação de biodiesel para a análise de sódio e potássio por espectrometria de emissão atômica em chama (FAES) (Oliveira *et al.*, 2009) e outro para determinação de fósforo por espectrofotometria (Mendow *et al.*, 2011). Sendo assim, tomando-se os cuidados necessários é possível converter o fósforo presente na matriz orgânica do biodiesel em uma forma inorgânica de forma eficiente. O método proposto apresentou limites de detecção e quantificação abaixo do limite de concentração máxima de fósforo estabelecido pelas normas;

apresenta a vantagem de não empregar solventes orgânicos e, além disso, permite o uso de soluções aquosas para a construção da curva analítica.

Os resultados deste estudo já foram publicados em:

Silveira, E.L.C.; Caland, L.B.; Tubino, M. Molecular absorption spectrophotometric method for the determination of phosphorus in biodiesel. *Fuel* **2011**, 90, 3485.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

O método espectrofotométrico proposto para a determinação de fósforo apresenta limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão compatíveis com as regulamentações para biodiesel que estabelecem uma concentração máxima de 10 mg kg^{-1} deste elemento (EU, USA, Brasil). Apresenta vantagens quando comparado ao método oficial (ICP OES), pois não necessita de solventes orgânicos como xileno e querosene. O método é fácil de ser realizado e oferece resultados a um custo relativamente baixo, além disso, pode ser realizado com equipamentos comumente presentes em laboratórios analíticos. Dessa forma, o método pode ser recomendado como uma alternativa para a determinação de fósforo em biodiesel.

O método envolvendo digestão por radiação ultravioleta e análise por cromatografia de íons, mostrou-se eficiente para a avaliação do teor de fósforo em lecitina de soja. Dessa forma, constitui-se como método alternativo que pode contribuir para o controle de qualidade da lecitina de soja comercial.

Capítulo 4: Determinação de ânions orgânicos e inorgânicos em biodiesel por cromatografia de íons

1. OBJETIVO

O objetivo do trabalho descrito neste capítulo foi a avaliação da presença de ânions orgânicos e inorgânicos em biodiesel empregando procedimentos de preparo de amostra por radiação UV e/ou extração líquido-líquido e análise por cromatografia de íons.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica referente a este capítulo aborda um pouco do histórico da cromatografia de íons, os princípios desta técnica, algumas de suas diversas aplicações e, além disso, trata ainda de procedimentos de preparo de amostras empregados em análises por cromatografia de íons.

2.1. Início do uso da cromatografia de íons

Em 1971, Small e colaboradores desenvolveram o primeiro método cromatográfico empregando troca iônica com o objetivo de separar e determinar lítio, sódio e potássio usando detecção condutivimétrica. A empresa Dow Chemical patenteou o sistema de supressão de condutividade e concedeu licença à empresa Durrum Instruments, que mais tarde tornou-se a Dionex, sendo então, a primeira empresa a comercializar equipamentos de cromatografia de íons (Michalski, 2006; Lucy, 2003). No ano de 1975, a empresa Dionex expôs o primeiro equipamento de cromatografia de íons comercial durante uma reunião da *American Chemical Society*, em Chicago, coincidindo com o primeiro artigo publicado sobre cromatografia de íons por Small, Stevens e Bauman (1975). Eles propuseram o princípio da redução (ou supressão) da condutividade de fundo de um eluente com força iônica elevada através do uso de uma segunda coluna supressora seqüencial, empregando uma fase estacionária de troca iônica de baixa capacidade e um detector de condutividade.

A cromatografia de íons, desde a sua introdução na década de 1970 passou por grandes avanços. Hoje pode ser considerada uma das técnicas analíticas mais versáteis para todos os tipos de compostos iônicos. Ela oferece uma ampla faixa de possibilidades para seleção de fases móveis e estacionárias e, em combinação com diferentes técnicas de detecção, apresenta excelente eficiência na resolução de problemas analíticos complexos, por ser adequada para a determinação rápida e simultânea de vários cátions e ânions orgânicos e inorgânicos. A cromatografia de íons apresenta, ainda, alta seletividade, uma ampla faixa dinâmica e boa sensibilidade para muitas aplicações (Seubert *et al.*, 2002).

A cromatografia de íons vem sendo empregada na análise de diversos tipos de amostras, por exemplo, águas (Jackson, 2001; Lopez-Moreno *et al.*, 2010; Michalski, 2006), amostras ambientais (Park *et al.*, 2002), coque de petróleo (Pereira, *et al.*, 2008), alimentos (Buldini *et al.*, 1997; Buldini *et al.*, 2001; Dugo *et al.*, 2007; Sangita *et al.*, 2008) e combustível etanol (ABNT/NBR 10894, 2007). No entanto, apesar da sua versatilidade, a cromatografia de íons ainda é pouco explorada para análise de biodiesel (Caland *et al.*, 2012; Application note Metrohm; Application note Dionex).

2.2. Fundamentos da cromatografia de íons

A cromatografia de troca iônica ou cromatografia de íons (CI) é uma técnica baseada em reação química que ocorre entre os íons de uma solução e grupos funcionais presentes em uma substância que podem fixar íons como resultado de forças eletrostáticas. Em teoria, íons que têm a mesma carga podem ser trocados de modo reversível entre as duas fases. O processo de troca iônica leva a uma condição de equilíbrio. A direção para a qual esta troca se processa depende da afinidade dos íons em solução com os grupos funcionais da fase estacionária (Eith *et al.*, 2006).

As fases estacionárias, também chamadas de colunas têm a função de promover a separação dos íons. A matriz de um trocador é constituída de um

material poroso, natural ou sintético, inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos, apresentando grupos trocadores iônicos. As matrizes, quanto ao material que as formam, são classificadas em inorgânicas e orgânicas, sendo naturais ou sintéticas. Por serem, em geral, mais eficientes, são amplamente utilizadas como matriz resinas orgânicas altamente polimerizadas com ligações cruzadas. Dependendo do grupo trocador ligado covalentemente à matriz, os trocadores iônicos são classificados em aniônicos e catiônicos. Esses trocadores iônicos são sempre acompanhados por contra-íons, de carga oposta ao grupo ligado ao suporte e de fácil substituição no processo de troca iônica. Os trocadores aniônicos, como o próprio nome indica, trocam ânions e apresentam, portanto, grupos iônicos positivos ligados à matriz (Collins *et al.*, 2006). Os trocadores aniônicos mais comuns são os grupos de amônio quaternário, aminas alquílicas e hidroxialquilaminas. Os trocadores catiônicos trocam cátions e apresentam grupos iônicos negativos ligados à matriz. Os trocadores catiônicos mais comuns são os grupos sulfonados e carboxilatos (Eith, *et al.*, 2006).

A Figura 4.1 ilustra um exemplo de fase estacionária comumente empregada em cromatografia de íons para a separação de ânions.

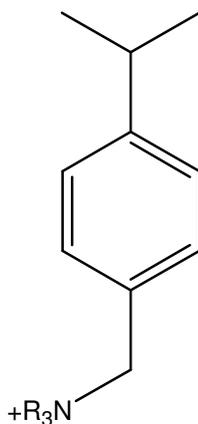


Figura 4.1. Exemplo de fase estacionária empregada na separação de ânions.

A Figura 4.2 ilustra o mecanismo de troca iônica numa coluna com grupos de amônio quaternário.

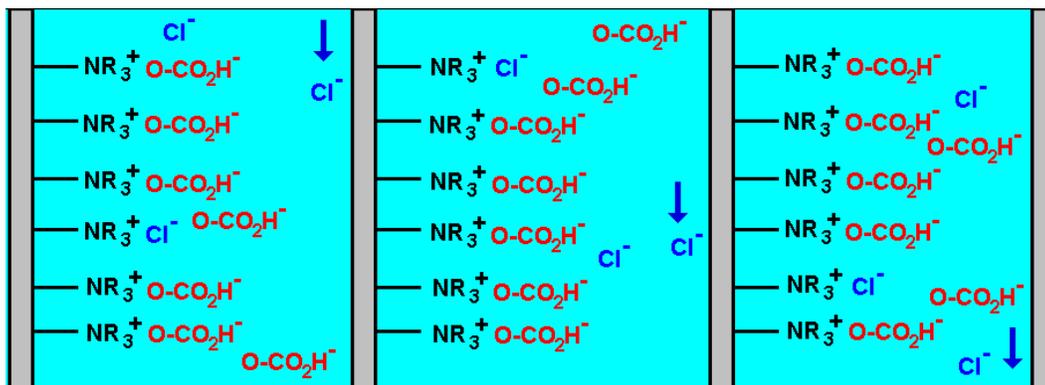


Figura 4.2. Mecanismo de troca iônica para a determinação de ânions.

O eluente (fase móvel) usado em cromatografia de íons geralmente consiste de uma solução aquosa de um sal adequado ou de uma mistura de sais. Em algumas ocasiões, pequenas quantidades de um solvente orgânico podem ser adicionadas. É necessário que o equipamento tenha uma bomba de alta pressão com a capacidade de levar o eluente para o sistema com o mínimo de pulsação possível. O principal componente do eluente é o íon de competição, que tem a função de eluir os componentes da amostra através da coluna em um intervalo de tempo razoável. As três principais propriedades do eluente que afetam as características de eluição dos íons do analito são: 1) pH do eluente; 2) natureza do íon de competição; 3) concentração do íon de competição. O pH do eluente pode ter efeitos profundos na forma em que o grupo funcional da matriz de troca iônica existe, e também na forma dos íons do eluente e do soluto. O coeficiente de seletividade, existente entre os íons de competição e um íon do soluto em particular, determinará o grau em que o íon de competição pode deslocar o íon do soluto da fase estacionária. A concentração do íon de competição exerce o principal efeito, pois influencia a posição do ponto de equilíbrio para equilíbrio de troca iônica. Quanto mais alta a concentração do íon de competição no eluente, mais efetivamente o eluente desloca íons do soluto da fase estacionária e, desta forma, mais rapidamente o soluto é eluído da coluna (Haddad e Jackson, 1995).

Diferentes sistemas de detecção são usados em cromatografia de íons. A seleção do detector adequado deve sempre estar em concordância com os problemas analíticos a serem resolvidos. Os principais requisitos de um detector são: alta sensibilidade de medição; sinal de medição proporcional à concentração do analito; pequenas ou mínimas variações na linha de base; baixo ruído de fundo (background). As técnicas de detecção mais empregadas em cromatografia de íons são condutometria, amperometria, potenciometria, espectrofotometria de absorção molecular além de espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (Eith *et al.*, 2006).

O modo de detecção por condutividade é o mais comumente empregado em cromatografia de íons (CI), sendo considerado o detector universal. Os avanços mais importantes desta técnica tem sido o desenvolvimento de novos supressores, os quais são usados em detectores condutimétricos a fim de melhorar a sensibilidade, especialmente para a determinação de ânions.

2.2.1. Técnica de supressão em cromatografia de íons

A detecção por condutividade apresenta vantagens, pois os íons em solução são eletricamente condutores, de forma que a condutividade é universal em resposta; e, além disso, esse tipo de detector é relativamente simples para construir, operar, responde de forma previsível às mudanças de concentração e é fácil de ser miniaturizado. Uma desvantagem apresentada pela detecção por condutividade foi a elevada condutância do eluente presente nas separações cromatográficas de íons. Esse problema foi resolvido introduzindo-se uma coluna supressora para o eluente, posicionada imediatamente após a coluna analítica de troca iônica. Essa coluna reduziu a condutância do ruído de fundo do eluente, aumentando simultaneamente a condutância elétrica dos íons do analito (Lucy, 2003; Small *et al.*, 1975; Weiss, 1995).

A cromatografia com supressão consiste em um método no qual um dispositivo adicional chamado supressor é inserido entre a coluna analítica e o detector de condutividade como mostra a Figura 4.3.

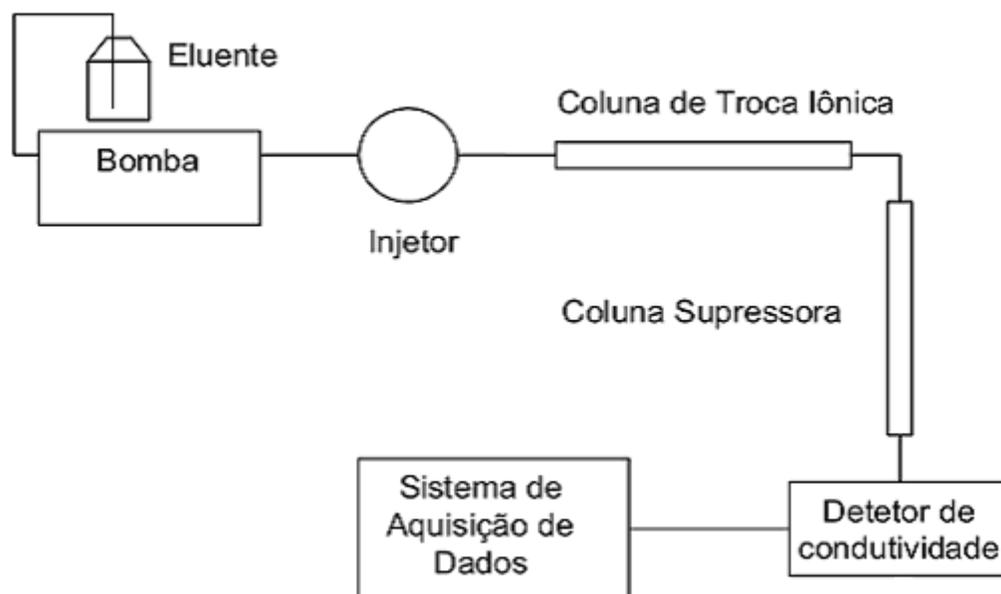


Figura 4.3. Diagrama esquemático da cromatografia de íons com detecção por condutividade com supressão. Adaptado da Figura 1, ref. Lucy (2003).

Na técnica de supressão, o chamado supressor é inserido entre a coluna de separação e o detector, e é por isso que essa técnica também é conhecida como “cromatografia de íons suprimida”. Tanto os eluentes como os analitos são modificados quimicamente no supressor, isto é de particular importância em relação à subsequente detecção de condutividade. O supressor tem a função de reduzir a condutividade de fundo do eluente e, se possível, aumentar a detectabilidade dos analitos.

A supressão é realizada com um trocador de cátion na forma H^+ fortemente ácida. Por exemplo, quando $NaHCO_3$ é usado como eluente e uma amostra contendo o íon cloreto, ocorrerão as seguintes reações:



O eluente bicarbonato de sódio é neutralizado de acordo com a equação 4.1, e uma vez que os íons de sódio são substituídos por prótons, diminui

drasticamente a condutividade de fundo do eluente. O analito Cl^- não é alterado (Equação 4.2), mas seu contra-íon Na^+ é trocado por H^+ , que tem uma condutividade equivalente consideravelmente maior. Uma vez que o detector se sensibiliza com a soma das condutividades do analito e do contra-íon como o sinal, as duas reações que ocorrem resultam em uma sensibilidade claramente maior (Eith *et al.*, 2006).

Na Tabela 4.1 estão listadas algumas substâncias que podem ser utilizadas como eluente e os produtos que são formados logo após a supressão.

Tabela 4.1. *Eluentes usados para detecção por condutividade com supressão química da condutividade de fundo.*

Eluente	Íon do eluente	Produto da supressão	Força de eluição
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	H_3BO_3	muito fraca
NaOH	OH^-	H_2O	fraca
NaHCO_3	HCO_3^-	$[\text{CO}_2] + \text{H}_2\text{O}$	fraca
$\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$	$[\text{CO}_2] + \text{H}_2\text{O}$	média
$\text{H}_2\text{NCHR}\text{COOH}/\text{NaOH}$	$\text{H}_2\text{NCH}(\text{R}')\text{COO}^-$	$\text{H}_3\text{NCHR}\text{COO}^-$	média
$\text{RNHCH}(\text{R}')\text{SO}_3\text{H}/\text{NaOH}$	$\text{RNHCH}(\text{R}')\text{SO}_3^-$	$\text{RNH}_2\text{CH}(\text{R}')\text{SO}_3^-$	média
Na_2CO_3	CO_3^{2-}	$[\text{CO}_2] + [\text{H}_2\text{O}]$	forte

Fonte: Weiss, 1995.

A mistura de carbonato de sódio e bicarbonato de sódio é a solução mais comumente empregada como eluente na separação de ânions, principalmente porque uma grande variedade de ânions orgânicos e inorgânicos pode ser separada com esta combinação de eluente. O ácido carbônico formado como produto da reação de supressão é fracamente dissociado, então a condutividade de fundo é muito baixa.

2.3. Procedimentos de preparo de amostras para análise por cromatografia de íons

Entre os procedimentos de preparo da amostra, a aplicação de um sistema de diálise on-line para remoção dos componentes de matrizes complexas como proteínas, surfactantes, particulados e compostos orgânicos são relatados na literatura (Ruiz-Calero e Galceran, 2005). Num sistema de cromatografia de íons automatizado com microdiálise on-line, a amostra é bombeada na célula de diálise na qual os íons difundem num canal de água. Em seguida, o dialisado é transferido para o loop de injeção e introduzido no sistema cromatográfico.

Para muitas amostras os procedimentos de pré-tratamento para a determinação de ânions inorgânicos por cromatografia de íons envolvem somente operações simples como filtração, diluição, ajuste de pH (Lopez-Ruiz, 2000), no entanto, quando se trata de matrizes complexas como o biodiesel estes procedimentos associados à diálise on-line não são suficientes para eliminar a matéria orgânica e/ou converter o analito para uma forma detectável, sendo necessários outros modos de preparo de amostra antes da análise. Procedimentos que empregam extração líquido-líquido e radiação ultravioleta têm apresentado grande eficiência no preparo de diversos tipos de amostras para análise por cromatografia de íons, tendo sido empregados neste trabalho. Eles serão discutidos a seguir.

2.3.1. Extração líquido-líquido

A extração do analito de amostras de combustível é um procedimento de preparo de amostra que combina as vantagens de separação do analito da matriz, transferindo-o para a fase aquosa e fazendo ao mesmo tempo uma pré-concentração. A extração líquido-líquido apresenta como principal vantagem a simplicidade na execução (Korn *et al.*, 2007).

Em extração líquido-líquido a partição é o único processo que ocorre quando dois líquidos estão envolvidos e é governada pela solubilidade. Dessa forma, o analito é extraído com base na sua solubilidade na fase extratora. Conseqüentemente, a seleção da fase extratora deve levar em conta a polaridade do analito, o tamanho e as interações físico-químicas que ocorrem entre o mesmo e a amostra e, também, entre ele e a fase extratora. Neste caso, duas fases líquidas competem pelo analito e quanto maior a solubilidade do analito no solvente extrator, em relação à matriz, maior será a eficiência da extração (Nerín *et al.*, 2009).

Dugo *et al.* (2007) desenvolveram um método para determinação de F^- , Cl^- , Br^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} e I^- em óleos vegetais por cromatografia de íons. Os ânions foram extraídos da matriz por extração líquido-líquido empregando solução mista de carbonato ($3,0 \text{ mmol L}^{-1}$) / bicarbonato de sódio ($3,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em banho ultrassônico. Recentemente, alguns trabalhos empregando extração líquido-líquido como pré-tratamento de amostras para análise de biodiesel foram reportados na literatura. Piovezan *et al.* (2010) determinaram Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} em biodiesel por eletroforese capilar após extração líquido-líquido empregando água como solvente extrator. Já o trabalho publicado por Nogueira e Lago (2011) mostra que a extração líquido-líquido é eficiente não apenas na extração dos cátions inorgânicos, mas também dos ânions PO_4^{2-} , SO_4^{2-} , $HCOO^-$, H_3CCOO^- e ainda do glicerol. A extração foi realizada com o eletrólito de separação (ácido 2-N-morfolinoetanosulfônico (MES)/histidina) 30 mmol L^{-1} . O trabalho desenvolvido por Caland *et al.* (2012) faz uso de um procedimento de extração líquido-líquido em meio aquoso ácido, com aquecimento e extração assistida por ultrassom para a determinação simultânea de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} em biodiesel por cromatografia de íons.

De forma geral, os procedimentos de preparo de amostra por extração líquido-líquido mostram-se eficientes na extração de cátions e ânions de matrizes complexas como o biodiesel e apresentam a vantagem de não utilizar solvente orgânico, uma vez que os métodos relatados na literatura fazem uso de água como solução extratora. Pensando em procedimento simples, de fácil

manipulação, custo relativamente baixo e, sobretudo, eficiente na extração de ânions desenvolveu-se neste trabalho um procedimento para extração de ânions presentes no biodiesel como pré-tratamento da amostra para posterior análise por cromatografia de íons.

2.3.2. Irradiação com ultravioleta

2.3.2.1. Fontes de radiação ultravioleta

A irradiação da amostra por ondas eletromagnéticas pode ser útil tanto na decomposição de interferentes, tais como substâncias orgânicas, como na derivatização de analitos. O termo derivatização compreende os processos de conversão química do analito em uma forma apropriada para possibilitar ou otimizar uma determinada técnica de detecção (Cavicchioli e Gutz, 2003).

A radiação ultravioleta (UV) constitui a porção do espectro eletromagnético localizada entre a radiação visível e os raios-X, com comprimentos de onda (λ) de 40 a 400 nm. A região UV é, geralmente, subdividida em UV-A ($400 < \lambda < 315$ nm), UV-B ($315 < \lambda < 280$ nm) e UV-C ($280 < \lambda < 100$ nm) ou, ainda, em ultravioleta próximo ($400 < \lambda < 200$ nm) e ultravioleta distante (ou no vácuo, $\lambda < 200$ nm) (Krug, 2010).

Em preparo de amostras, as fontes mais utilizadas são as lâmpadas de vapor de mercúrio de alta, média ou de baixa pressão, nas quais a irradiação é o resultado do relaxamento (relaxação) luminescente de átomos de mercúrio excitados durante processos de colisão com correntes de elétrons e íons no interior de tubos fechados (Golimowski e Golimowska, 1996; Krug, 2010).

A radiação UV carrega, geralmente, energia suficiente para promover transições eletrônicas nas ligações químicas de uma série de compostos, especialmente orgânicos. Esta absorção de energia é o primeiro passo de toda reação fotoquímica, com a formação de espécies excitadas, na maioria das vezes muito instáveis, que evoluem por processos não fotoquímicos (secundários),

podendo resultar em rearranjos internos, ionização ou, ainda, na dissociação das ligações químicas. A cisão homolítica destas ligações é que dá origem aos chamados radicais livres, isto é, moléculas dotadas de um elétron desemparelhado (elétron livre) num de seus orbitais externos. Na cisão homolítica os elétrons são igualmente repartidos entre os radicais formados. Esta condição torna as moléculas extremamente reativas, com características de potente oxidante, ou seja, de receptor de elétrons, particularmente em relação às moléculas orgânicas (Krug, 2010).

Em solução aquosa, o processo pode atingir as moléculas de oxigênio dissolvido, seja por interação destas com radicais alquila ($R\cdot$), seja por absorção direta de radiação UV por parte de O_2 com formação do oxigênio singlete (1O_2). O processo pode envolver a formação de agentes oxidantes intermediários não radicalares como O_3 e H_2O_2 , mas de modo geral os pesquisadores são concordes em considerar o radical hidroxila $\cdot OH$ como a principal espécie oxidante. A geração dos radicais pode ser potencializada com a utilização de agentes auxiliares, como H_2O_2 , Fe^{2+} , Fe^{3+} , $S_2O_8^{2-}$, O_3 , NO_2^- , NO_3^- (em fase homogênea) e TiO_2 (em fase heterogênea), que podem atuar de forma catalítica em alguns casos, sendo a princípio regenerados durante o processo (Golimowski e Golimowska, 1996; Krug, 2010).

2.3.2.2. Aplicações da foto-oxidação UV no pré-tratamento de amostras

O uso da radiação UV no preparo de amostra embora geralmente seja associado à decomposição de matéria orgânica para a determinação de compostos ou elementos inorgânicos, também há possibilidade de se valer de reações fotoquímicas para transformações prévias dos analitos, em procedimentos que, portanto, não se configuram como processos de destruição ou degradação de moléculas (Cavicchioli e Gutz, 2003).

O elemento fósforo, por exemplo, é geralmente determinado como ortofosfato e se faz necessário uma etapa pré-cromatográfica para transformar

todas as formas de fósforo presentes na amostra antes da injeção no sistema cromatográfico (Ruzi-Calero e Galceran, 2005). O uso de peróxido de hidrogênio (22 %) sob condições ácidas tem sido proposto para a oxidação de espécies de fósforo, nitrogênio e enxofre para seus respectivos oxoânions usando digestão assistida por microondas (Colina e Gardiner, 1999) antes da análise por cromatografia de íons. A fotólise UV em conjunto com um reagente oxidante (H_2O_2 22 %) também tem sido empregada para a remoção da matriz orgânica de várias amostras como, por exemplo, óleos vegetais e gorduras (Buldini *et al.*, 1997), mel (Buldini *et al.*, 2001), leite (Buldini *et al.*, 2002), entre outras. Buldini *et al.* (1997) mostraram que o procedimento de saponificação seguido de fotólise UV é eficiente para remover completamente a matriz orgânica, a qual interfere fortemente na determinação de algumas espécies inorgânicas em óleos vegetais e gorduras. O trabalho de Buldini e Sharma (1993) mostra que a radiação UV foi empregada com sucesso no preparo de amostras de sabões e detergentes para a determinação de fósforo total por cromatografia de íons.

A radiação ultravioleta também tem mostrado eficiência no preparo de amostras de alimentos para determinação de selênio por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) como mostrado no trabalho de Manjusha *et al.* (2007). No trabalho, dentre outras amostras, amostras de amendoim, farinha de arroz e trigo e material vegetal da raiz de beterraba foram submetidas a fotólise UV por 1h. Antes da digestão foram adicionados ácido nítrico concentrado e H_2O_2 30 % e durante a digestão em intervalos de 15 minutos eram adicionados 15 μL de H_2O_2 30 % para manter as condições oxidantes durante a digestão. O procedimento proposto mostrou-se adequado para eliminação da matéria orgânica nas amostras estudadas.

Higuchi *et al.* (1998) propuseram a decomposição foto-oxidativa de compostos de fósforo para ortofosfatos e espectrofotometria acoplada em sistema de injeção em fluxo para a determinação de fósforo total em águas de rios. Os autores observaram que para os compostos como glicose, ribose, riboflavina e glicerofosfato por apresentarem uma ligação éster, a oxidação só foi efetiva quando empregou-se peroxidissulfato em meio ácido e que a radiação UV foi

menos efetiva na decomposição de compostos de fósforo possuindo uma ligação de fosfato condensado, como ADP, ATP, pirofosfato e tripolifosfato.

Buldini *et al.* (1999) realizaram um estudo visando a determinação dos metais (Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn) em diferentes tipos de vinhos. Neste caso, também foi empregado H_2O_2 como agente oxidante e observaram que os vinhos com baixo teor orgânico foram degradados mais rapidamente do que aqueles com alto teor de compostos orgânicos.

Dado o exposto, percebe-se que a fotólise oxidativa tem apresentado eficiência tanto na degradação da matéria orgânica de diversas amostras, como para a conversão de analitos. Sendo assim, neste trabalho vários ensaios foram realizados com radiação ultravioleta com o objetivo de determinar fósforo total em biodiesel na forma do íon fosfato por cromatografia de íons.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos utilizados

- Balança analítica modelo AX 200, ($\pm 0,0001$ g) (Shimadzu);
- Balança analítica modelo AX 205 DeltaRange®, ($\pm 0,00001$ g) (Mettler Toledo);
- Banho ultrassônico (Ultracleaner 14000 unique);
- Bomba de aquário;
- Cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama (marca Agilent);
- Cromatógrafo de íons modelo 882 Compact IC (Metrohm) conectado a um amostrador automático modelo 863 Metrohm com capacidade para 36 vials de 11 mL;
- Digestor UV 705 Metrohm;
- Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupolo (TQD), modelo Quattro Micro API – ESI, Waters.
- Estufa (Quimis);
- Lâmpadas de vapor de mercúrio (100 e 500 W)
- Rancimat 873 Metrohm;
- Ozonizador residencial (Ricozon);
- Sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore);
- Tubos de quartzo e vidrarias de uso rotineiro em laboratório.

As Figuras 4.4 e 4.5 mostram o cromatógrafo de íons com amostrador automático e o digestor UV empregados neste trabalho.



Figura 4.4. Cromatógrafo de íons modelo 882 compact IC Metrohm



Figura 4.5. Digestor UV 705 Metrohm

3.2. Reagentes, soluções e amostras

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) obtida de um sistema de purificação Milli-Q. As amostras de biodiesel de soja, girassol, canola e sebo bovino foram sintetizados em nosso laboratório conforme procedimento mostrado no capítulo 2 desta tese. O biodiesel de óleo de soja bruto foi fornecido por uma indústria. Todos os reagentes empregados foram de grau analítico e são listados a seguir.

- Acetato de bário, $(\text{H}_3\text{CCOO})_2\text{Ba}$ (Synth);
- Acetato de sódio $(\text{H}_3\text{CCOONa})$ (Synth);
- Ácido acético, H_3CCOOH (Synth);
- Ácido clorídrico, HCl (Synth);
- Ácido fórmico, HCOOH (Synth);
- Ácido fosfórico, H_3PO_4 85 %, (CHEMCO);
- Ácido nítrico, HNO_3 (Synth);
- Ácido sulfúrico, H_2SO_4 (Synth);
- Álcool etílico, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 99,5 % (Synth);

- Bicarbonato de sódio, NaHCO_3 (Vetec);
- Carbonato de sódio, Na_2CO_3 (Nuclear);
- Cloreto de sódio, NaCl , (Synth);
- 2-cloro-2-metilpropano, $(\text{CH}_3)_3\text{CCl}$, 99 % (Sigma-Aldrich);
- Formiato de sódio, HCOONa , (Quimis);
- Hidróxido de sódio, NaOH (Synth);
- Hidróxido de potássio, KOH (Synth);
- Lecitina de soja purex (Inlab);
- Linoleato de metila $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$, 98,5 % (Sigma-Aldrich);
- Peróxido de hidrogênio (30%), H_2O_2 (Sigma-Aldrich);
- Solução padrão de 1000 mg L^{-1} de fosfato (Sigma-Aldrich);
- Solução padrão de 1000 mg L^{-1} de sulfato (Sigma-Aldrich).

3.3. Limpeza das vidrarias

Antes do uso todas as vidrarias foram lavadas e enxaguadas com água desionizada. Após o uso, as vidrarias foram primeiramente lavadas com álcool para eliminação do biodiesel impregnado nas mesmas e a seguir foram lavadas exaustivamente com água desionizada para garantir a remoção dos íons.

3.4. Procedimento Experimental

3.4.1. Preparo das soluções de referência para construção das curvas analíticas

Soluções estoque dos padrões em concentração de 1000 mg L^{-1} dos íons acetato, formiato e cloreto foram preparadas pela pesagem da massa adequada de cada sal e dissolução em água desionizada. Os sais utilizados foram acetato de sódio, formiato de sódio e cloreto de sódio. As soluções estoque de 1000 mg L^{-1} dos íons fosfato e sulfato foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,

USA). Soluções padrão mistas foram preparadas a partir da solução estoque nas seguintes concentrações: acetato (1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹); formiato (2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹); cloreto (0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 mg L⁻¹); fosfato (1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹) e sulfato (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg L⁻¹). As soluções padrão foram estocadas em frascos de polietileno.

3.4.2. Determinação de fósforo em biodiesel

Alguns testes foram realizados com o objetivo de determinar fósforo total em biodiesel na forma de fosfato por cromatografia de íons. Os procedimentos empregados serão descritos a seguir.

As análises cromatográficas de íons foram realizadas num cromatógrafo modelo 882 Compact IC (Metrohm) equipado com bomba isocrática e sistema de diálise. Uma solução mista composta por Na₂CO₃ 3,2 mmol L⁻¹ e NaHCO₃ 1,0 mmol L⁻¹ foi usada como eluente, purgado em ultrassom durante 15 minutos para remoção dos gases dissolvidos (principalmente CO₂). O volume de injeção da amostra era de 20 µL, empregou-se coluna analítica Metrosep A Supp 5 (4 x 150 mm) ou Metrosep A Supp 5 (4 x 250 mm) a base de substrato polimérico funcionalizado com grupamentos de amônio quaternário. A detecção foi feita por um detector de condutividade. A condutividade do eluente foi suprimida através do supressor aniônico no modo de regeneração por auto-supressão com solução de H₂SO₄ 100 mmol L⁻¹. A aquisição e tratamento de dados foram feitos usando o software MagicNet 2.0 (Metrohm).

3.4.2.1. Aplicação do preparo de amostra empregado para o método espectrofotométrico

Inicialmente, fez-se uma simulação para avaliar a possibilidade de aplicar o mesmo procedimento de preparo de amostras empregado no método espectrofotométrico, mostrado no capítulo 3 desta tese, para a determinação de

fosfato por cromatografia de íons. O procedimento consistiu da calcinação da amostra e dissolução das cinzas em solução de ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

3.4.2.1.1. Teste com acetato de bário para eliminar o sulfato na forma de BaSO_4 e adição de HNO_3 para eliminar o íon acetato

Prepararam-se 25 mL de uma solução contendo $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de fosfato, em H_2SO_4 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. A esta solução foram adicionados 1,0 mL de uma solução de acetato de bário $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Após centrifugação, recolheu-se 13,0 mL do sobrenadante, mediu-se o pH e ajustou-se para pH 10 com adição de NaOH 50 % m/v. A amostra foi analisada por cromatografia de íons nas condições citadas anteriormente. Num segundo procedimento, aumentou-se o volume da solução de acetato de bário e para a remoção do íon acetato da amostra após centrifugação, adicionou-se solução de HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Para remoção do íon nitrato as amostras foram levadas a banho-maria até secura completa e o resíduo solubilizado em água e transferida para balão volumétrico de 25,0 mL e completado com água desionizada. Em seguida, foram analisadas por cromatografia de íons.

3.4.2.2. Digestão por Irradiação ultravioleta (UV)

Vários procedimentos de fotólise UV foram empregados para promover a oxidação do elemento fósforo a íons fosfato. Inicialmente testou-se a digestão utilizando um digestor UV Metrohm 705 e também irradiação através de uma lâmpada de mercúrio de alta pressão.

3.4.2.2.1. Digestão empregando o digestor UV Metrohm 705

O equipamento e as condições empregadas foram aquelas já citadas, no capítulo 3, para a determinação de fosfato em lecitina de soja por cromatografia de íons.

3.4.2.2.1.1. Digestão direta da amostra com adição de H₂O₂

Amostras de biodiesel foram digeridas empregando-se um digestor UV 705 Metrohm, variando-se a massa de amostra (0,1 a 0,4 g) e o tempo de irradiação (1, 2 e 5 h) com adição de 0,5 mL de H₂O₂ 30 % como agente oxidante. As amostras foram fortificadas com o padrão lecitina de soja para conterem 40 mg kg⁻¹ de fósforo. Após o tempo determinado para digestão, as amostras foram transferidas para balão volumétrico de 25,0 mL e completou-se o volume com água. O pH foi ajustado, gota a gota, para pH 9,0 com solução de NaOH 5,0 mol L⁻¹. Observou-se que em alguns casos, houve a formação de sabão, devido a adição de hidróxido de sódio. Todas as amostras foram filtradas em filtro cromatográfico de 0,45 µm (Millipore) antes da análise por cromatografia de íons.

3.4.2.2.1.2. Saponificação prévia da amostra

O procedimento foi baseado no trabalho de Buldini *et al.* (1997) para determinação de íons em óleos vegetais também por cromatografia de íons. Diretamente nos tubos de quartzo adequados para o digestor UV 705 Metrohm pesou-se aproximadamente 1,0 g de biodiesel de soja fortificado com fósforo na forma de lecitina de soja. Foram adicionados 2,0 mL de etanol, 2,0 mL de água e 0,5 g de KOH. Esta mistura foi submetida à saponificação por 30 minutos em banho-maria a 50 °C. Os tubos de quartzo foram fechados com tampas de PTFE para prevenir perda da solução e proteger contra contaminação. Em seguida foram adicionados 0,1 mL de H₂O₂ 30 % no início e a cada 10 minutos de radiação. A amostra foi submetida a fotólise UV por um período de 80 minutos no

digestor UV. Após a digestão, a amostra foi resfriada, diluída para 25 mL com água desionizada e analisada por cromatografia de íons.

3.4.2.2.2. Irradiação UV com lâmpada de vapor de mercúrio

Foram realizados testes empregando duas lâmpadas de vapor de mercúrio cujos bulbos externos de vidro foram retirados. O primeiro teste foi realizado com lâmpada 100 W, numa caixa fechada, irradiando diretamente na amostra e o segundo com uma lâmpada de 500 W posicionada horizontalmente a 10 cm de distância da amostra. Nos dois casos foram pesados cerca de 10 g de biodiesel de soja (contendo $40,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de fósforo) em béquer. Adicionou-se inicialmente 50 μL de HNO_3 1 mol L^{-1} , 0,5 mL de H_2O_2 30 % e 0,1 mL a cada 1 h e deixou-se sob radiação UV por 10 h. A seguir foram adicionados 20 mL de água desionizada e agitou-se por 20 minutos por agitação magnética. Os frascos foram então colocados em banho termostático a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Na sequência levou-se para um banho ultrassônico por 15 minutos e, em seguida, filtrou-se em papel de filtro quantitativo. A fase aquosa foi coletada em balão de 25 mL e o volume completado com água desionizada. Filtrou-se a amostra em filtro cromatográfico de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore) e analisou-se por cromatografia de íons.

3.4.2.3. Digestão por ozonólise

Empregou-se um ozonizador residencial para ozonizar as amostras de biodiesel. Foi passado ar através do ozonizador com o auxílio de uma bomba de aquário, borbulhando o ozônio gerado dentro da amostra. Amostras de biodiesel de soja (10 g) foram pesadas diretamente em tubos de vidro e ozonizadas por um período de 10 h. Adicionou-se, a seguir, 20,0 mL de uma solução mista de Na_2CO_3 $1,7 \text{ mmol L}^{-1}$ e NaHCO_3 $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ seguido o procedimento de extração líquido-líquido já citado na secção anterior (3.4.2.2.2.) para análise por cromatografia de íons. O sistema empregado para ozonização das amostras de biodiesel está mostrado na Figura 4.6.

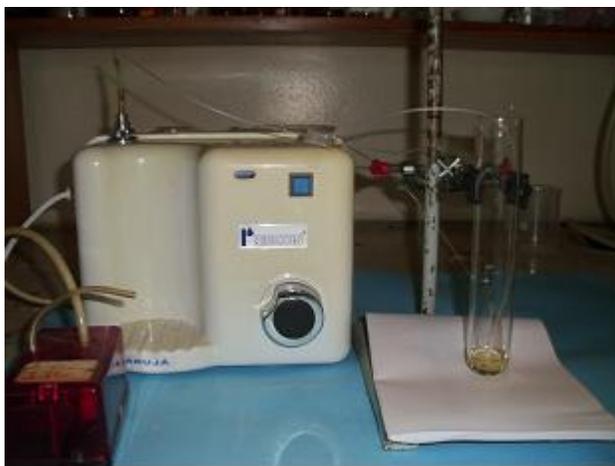


Figura 4.6. Sistema empregado para a ozonização das amostras.

3.4.2.3.1. Digestão por ozonólise associada à irradiação UV

Amostras de biodiesel de soja, aproximadamente 10,0 g, foram pesadas diretamente em tubos de vidro e submetidas simultaneamente à ozonização através de ozonizador residencial e à irradiação UV. Foi usada, como fonte de UV, uma lâmpada de mercúrio de 500 W sem o bulbo externo. Ela foi posicionada horizontalmente acima dos tubos de vidro. Após 10 h as amostras foram submetidas ao mesmo procedimento citado na secção 3.4.2.2.2 para extração empregando a mistura de Na_2CO_3 $1,7 \text{ mmol L}^{-1}$ e NaHCO_3 $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ como solução extratora.



Figura 4.7. Sistema empregado para a ozonização das amostras e irradiação UV.

3.4.2.4. Digestão por radiação UV empregando tubos de quartzo

Aproximadamente 2,0 g de biodiesel de soja foram pesados em tubos de quartzo (18 cm de altura e 2 cm de diâmetro). Foi adicionado 1,0 mL de H₂O₂ 30%. A mistura foi submetida à radiação ultravioleta por 3 h. A lâmpada foi posicionada embaixo do tubo de quartzo a 5 cm de distância do mesmo. Acoplado ao tubo colocou-se um condensador para refluxo para promover o resfriamento da amostra e evitar o aquecimento em excesso. Após 3 h de radiação, adicionou-se 10,0 mL de água desionizada e procedeu-se o procedimento de extração já citado anteriormente na secção 3.4.2.2.2. O procedimento foi realizado para biodiesel de soja e também para um padrão de éster, o linoleato de metila.



Figura 4.8. Sistema utilizado para irradiação UV com tubo de quartzo acoplado ao condensador.

3.4.3. Determinação do teor de álcool em biodiesel por cromatografia a gás

O teor de álcool nas amostras foi determinado pelo método de calibração interna, conforme sugerido na norma EN 14110. Três soluções de referência foram preparadas. A mesma sugere o preparo de três soluções analíticas contendo 0,5%, 0,1 % e 0,01 % de metanol e o uso de propanol como padrão interno. Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de 0,5 % m/m de metanol e etanol

em biodiesel purificado e aquecido a 110 °C para garantir a eliminação de álcool no biodiesel. Em seguida, preparou-se soluções de 0,1 % e 0,01 % por diluição da solução estoque de 0,5 % m/m de álcool.

Empregou-se um equipamento de cromatografia a gás com detector de ionização em chama. Pesou-se 5 g da amostra ou da solução padrão em um frasco de headspace e adicionou-se 5 µL de 2-propanol. Ultrassonificou-se a mistura por 5 minutos e aqueceu-se a 80 °C durante 45 minutos com agitação a 500 rpm. Após acondicionamento, 500 µL do vapor da amostra foram injetados no cromatógrafo. Adotou-se as seguintes condições cromatográficas: coluna HP 5; temperatura do forno 50 °C; temperatura do injetor 150 °C; temperatura do detector 150 °C e H₂ como gás de arraste.

3.4.4. Determinação do teor de ésteres em biodiesel por cromatografia a gás

A composição em ésteres das amostras de biodiesel estudadas foi determinada utilizando um cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama. Aproximadamente 0,1 g da amostra foi dissolvida em 1 mL de iso-octano. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna HP 5 (50 m x 250 µm x 0,25 µm); temperatura do injetor e detector de 250 °C; split 1:50 e H₂ como gás de arraste.

Os ésteres foram identificados por comparação direta com a mistura padrão. A porcentagem individual dos ésteres foi calculada em relação à área total do cromatograma. Como os diferentes ésteres têm comprimento da cadeia carbônica semelhante, assumiu-se que eles têm o mesmo fator de resposta e volatilidade, o que permitiu fazer uma comparação direta das áreas dos picos para determinar a composição da amostra.

3.4.5. Determinação da estabilidade oxidativa de amostras de biodiesel

A estabilidade oxidativa das amostras de biodiesel foi avaliada através do método Rancimat[®], recomendado pela norma EN14112. O método consiste em expor a amostra (3,0 g) a um fluxo de ar (10 L h⁻¹) a 110 °C. A formação dos produtos da oxidação, no caso, ácidos orgânicos voláteis, é monitorada através de medidas de condutividade da fase aquosa coletora dos compostos orgânicos voláteis. Um rápido aumento da taxa de oxidação é observado no ponto de indução (PInd), no qual se constata um aumento do índice de peróxido, absorção de oxigênio e formação de compostos voláteis.

3.4.6. Análise de amostras de biodiesel por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)

Amostras de biodiesel de soja após o procedimento de irradiação ultravioleta e extração líquido-líquido foram analisadas por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS). Empregou-se um equipamento Quattro Micro API – Waters – ESI operando no modo positivo e negativo. As condições de análise foram as seguintes: Capilar 3 kV; cone 30 V; temperatura da fonte 150 °C; temperatura de dessolvatação 300 °C.

A amostra foi introduzida por infusão direta, após diluição em acetonitrila/água 1:1 com 0,1 % de ácido fórmico. A faixa de massa monitorada foi de 80 a 800 u. O sinal analítico referente ao ácido glicerofosfórico foi identificado com base na razão massa/carga (m/z) do íon desse composto.

3.4.7. Determinação de acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato em biodiesel por cromatografia de íons

Os testes anteriores mostraram que seria possível a determinação do íon fosfato, proposto inicialmente, mas também dos íons inorgânicos cloreto e sulfato, como também dos íons orgânicos acetato e formiato. Sendo assim, aplicou-se o procedimento de extração líquido-líquido para amostras de biodiesel de óleos de soja, girassol, soja bruto, canola e sebo bovino com o objetivo de determinar estes ânions por cromatografia de íons.

3.4.7.1. Extração líquido-líquido assistida por ultrassom

Aproximadamente 10 g das amostras de biodiesel foram pesadas em béquer de 150 mL. Adicionou-se 20 mL de água desionizada (solução extratora) e submeteu-se a agitação magnética por 20 minutos. Deixou-se a mistura em banho termostático a 85 °C por 30 minutos, seguidos de 15 minutos em ultrassom. Após filtração em papel de filtro quantitativo, a fase aquosa foi coletada em balão de 25 mL e o volume completado com água desionizada. A amostra foi então filtrada em filtro cromatográfico de 0,45 µm e analisada por cromatografia de íons.

3.4.7.1.1. Fortificação das amostras de biodiesel

As amostras foram fortificadas de forma a avaliar a exatidão do método através do teste de recuperação dos analitos. A fortificação das amostras com ácido acético, ácido fórmico, 2-cloro-2-metilpropano, ácido fosfórico e ácido sulfúrico foi realizada pelo preparo de uma solução estoque de cada ânion em etanol e então volumes destas soluções etanólicas foram adicionados às amostras de biodiesel. A homogeneização foi feita por agitação magnética durante aproximadamente 10 minutos. O procedimento de extração dos ânions foi realizado da mesma forma que para as amostras sem fortificação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Determinação de fósforo por cromatografia de íons*

4.1.1. **Aplicação do procedimento de preparo de amostra já empregado para o método espectrofotométrico desenvolvido no capítulo 3**

Analisou-se uma solução padrão de fosfato (20 mg L^{-1}) preparada em ácido sulfúrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para simular o preparo de amostra de biodiesel por calcinação e dissolução em H_2SO_4 . Como não é possível a introdução direta dessa amostra no cromatógrafo de íons, devido aos íons sulfato presentes em alta concentração, resolveu-se adicionar acetato de bário para promover a retirada do íon sulfato pela precipitação na forma de sulfato de bário. No entanto, foi observada apenas uma pequena diminuição na concentração do íon sulfato. Por outro lado, porém, o íon acetato aparecia, conseqüentemente, em altas concentrações. Isto provocaria uma contaminação da coluna também por este íon. Dessa forma, aumentou-se a concentração de acetato de bário adicionada à amostra e adicionou-se HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para promover a formação de ácido acético e diminuir a concentração do íon acetato. A amostra foi submetida à secura completa em banho-maria para eliminação do íon nitrato.

Como pode ser visto nos cromatogramas mostrados na Figura 4.9, houve uma diminuição da concentração dos íons acetato, enquanto os íons sulfato continuavam presentes em elevadas concentrações. Por outro lado, a recuperação obtida para o íon fosfato foi muito baixa, aproximadamente 30 %, levando a inferir que este íon pode estar co-precipitando juntamente com o sulfato de bário.

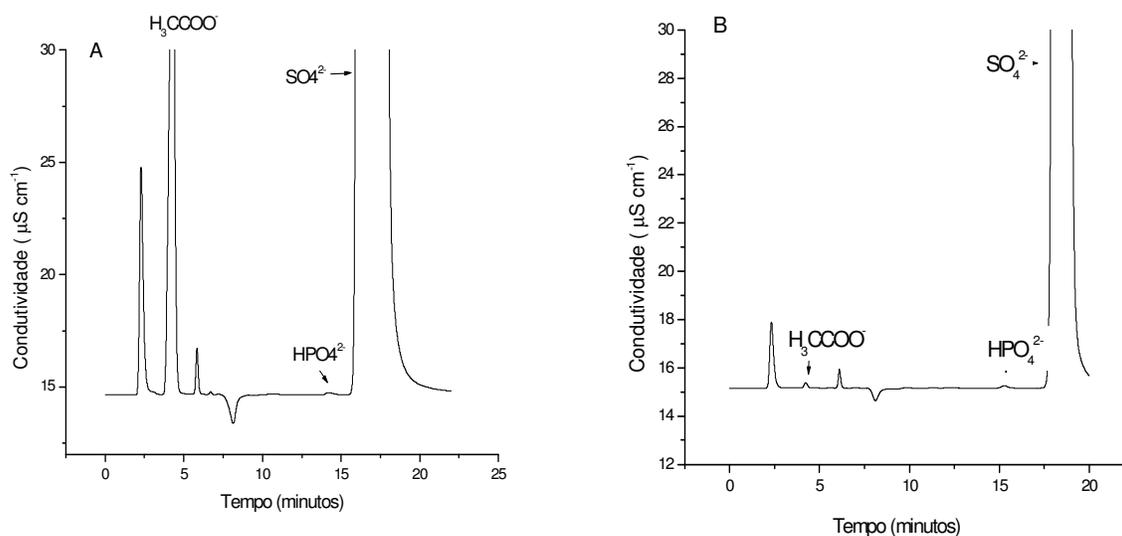


Figura 4.9. Cromatogramas obtidos para uma solução contendo 20 mg L^{-1} de fosfato: (A) adição de acetato de bário e (B) acetato de bário $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Estes testes mostraram que não é adequado utilizar o procedimento de preparo de amostra por calcinação via seca com solubilização das cinzas em ácido sulfúrico para análise por cromatografia de íons, devido principalmente a acidez da amostra e a contaminação da coluna por íons sulfato.

4.1.2. Digestão por Irradiação Ultravioleta (UV)

4.1.2.1. Digestão empregando o digestor UV Metrohm 705

4.1.2.1.1. Digestão direta da amostra com adição de H_2O_2

Analisou-se as amostras de biodiesel de soja, sebo bovino, óleo de soja bruto e canola sem adição de lecitina de soja e em nenhum dos casos observou-se a presença do pico referente ao íon fosfato, cujo tempo de retenção é de 15,15 minutos. Foram analisadas ainda amostras de biodiesel de soja fortificadas ($40,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de fósforo) com lecitina de soja. Variou-se a massa de amostra e o tempo de irradiação. Para estas amostras foi possível identificar um pico referente ao íon

fosfato, porém em concentrações muito abaixo do esperado. Na Figura 4.10 está mostrado um cromatograma da amostra de biodiesel de soja, onde os melhores resultados foram de 42 % de recuperação dos íons fosfato para 0,2235 g de amostra e 5 h de radiação UV empregando o digestor UV Metrohm.

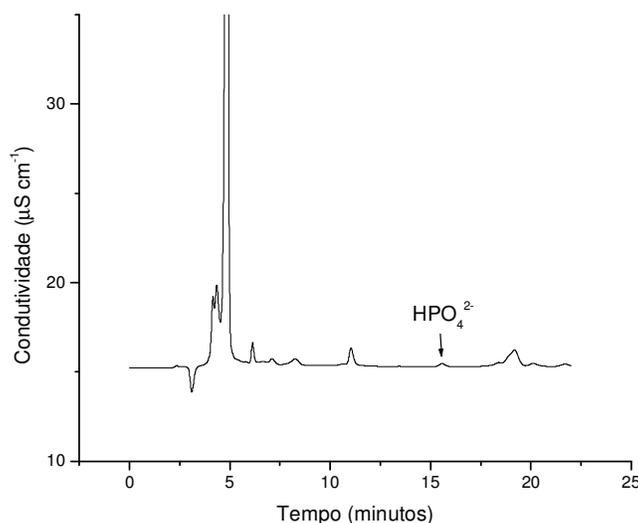


Figura 4.10. *Cromatograma obtido para uma amostra de biodiesel de soja, objetivando a análise de fósforo.*

O procedimento de digestão direta do biodiesel não apresentou resultados satisfatórios, pois a recuperação foi muito baixa e, além disso, necessita-se de um volume maior de amostra, já que o elemento fósforo quando presente em biodiesel estará em baixas concentrações. Resolveu-se então realizar um procedimento que permitisse utilizar um volume maior de amostra.

4.1.2.1.2. Saponificação

Realizou-se o procedimento de saponificação da amostra seguido da digestão por irradiação UV com adição de H_2O_2 durante a fotólise com a finalidade de fornecer radicais OH^\bullet . Tais radicais deveriam acelerar a decomposição dos componentes orgânicos ainda presentes na matriz ao final da etapa de saponificação. Além disso, os produtos da decomposição do peróxido de

hidrogênio são água e oxigênio, os quais não interferem no curso das análises. A saponificação e fotólise UV combinadas têm mostrado eficiência na diminuição do tempo requerido para a fotólise UV destruir completamente compostos de cadeia longa presentes em óleos e gorduras, conforme mostrado por Buldini *et al.* (1997). No entanto, pode-se perceber na Figura 4.11 que a saponificação seguida de radiação UV durante 80 minutos com adição de H_2O_2 não foi eficiente para promover a oxidação do fósforo a fosfato, pois não aparece o pico em tempo de retenção de 15 minutos. Após a digestão obteve-se uma solução transparente, porém muito viscosa. Vale ressaltar que ocorreram problemas com controle da temperatura a 90 °C. Apesar do sistema de resfriamento ar/água do digestor algumas amostras entravam em ebulição e derramavam fora do tubo de quartzo. Sendo assim, não foi dada continuidade aos testes com saponificação prévia da amostra.

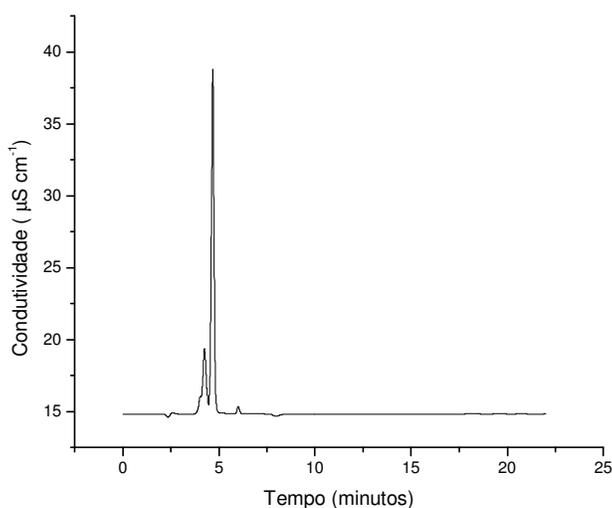


Figura 4.11. *Cromatograma obtido para uma amostra de biodiesel de soja após pré-tratamento por saponificação.*

4.1.2.2. Irradiação com lâmpada de vapor de mercúrio

Os testes realizados diretamente com as lâmpadas de vapor de mercúrio (sem o bulbo de vidro) não apresentaram resultados satisfatórios para conversão do fósforo a fosfato. Todas as amostras analisadas foram fortificadas com lecitina

de soja e, portanto, a concentração de fósforo presente nas amostras era de aproximadamente $40,0 \text{ mg kg}^{-1}$. Os cromatogramas obtidos com estes testes são mostrados nas Figuras 4.12 e 4.13. Observa-se que em todos os casos não aparece o pico referente ao fosfato ou, quando aparece, é de pequena intensidade.

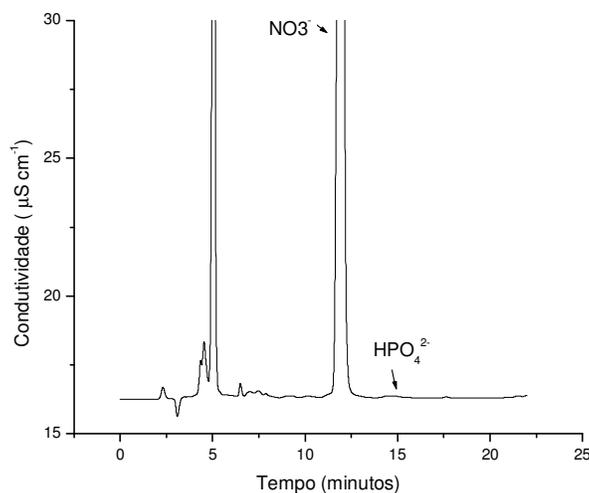


Figura 4.12. Cromatograma obtido para amostra de biodiesel de soja, pré-tratamento por irradiação UV com lâmpada 100 W e adição de HNO_3 .

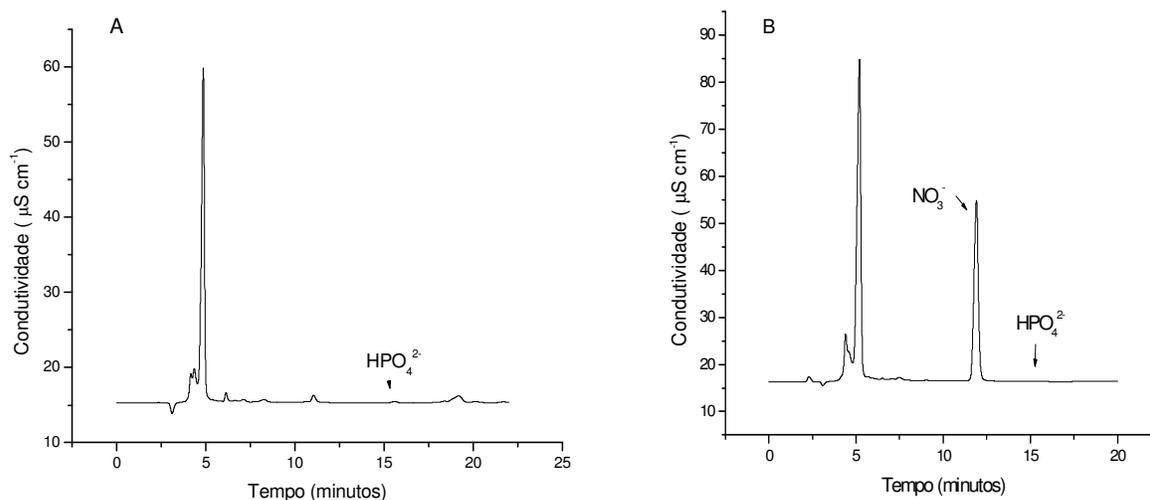


Figura 4.13. Cromatograma para biodiesel de soja, pré-tratamento por irradiação UV com lâmpada de mercúrio 500 W (A): sem HNO_3 ; (B) com adição de HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Os valores de recuperação obtidos para fosfato nos casos anteriormente apresentados foram abaixo de 10 %. No entanto, esperava-se que ocorresse a conversão para fosfato, pois H₂O₂ quando exposto a luz UV, se decompõe formando radicais OH[•]. Além disso, pela adição de HNO₃, uma quantidade maior destes radicais estavam presentes uma vez que os íons nitrato são também uma fonte dos mesmos através da equação 4.3 (Golimowski e Golimowska, 1996).



4.1.2.3. Digestão por ozonólise e radiação UV

Testou-se a ozonólise para oxidação do elemento fósforo a fosfato, pois sabe-se que o ozônio é um agente oxidante poderoso ($E_0 = +2,08$ V) quando comparado, por exemplo, ao peróxido de hidrogênio ($E_0 = +1,78$ V). A molécula de O₃ pode reagir diretamente com outras moléculas orgânicas ou inorgânicas via adição eletrofílica. O ataque eletrofílico do O₃ pode acontecer a átomos com densidade de carga negativa (N, P, O ou carbonos nucleofílicos) ou a ligações duplas ou triplas do tipo C-C, C-N e N-N. Indiretamente, o ozônio pode reagir através de reação radicalar (principalmente OH[•]) que é gerado pela decomposição do ozônio (Kunz *et al.*, 2002), como mostrado nas equações da Figura 4.14.

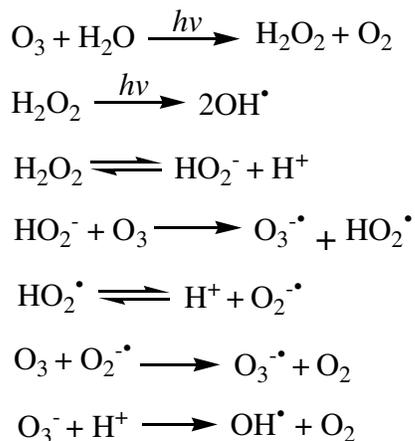


Figura 4.14. Mecanismos de decomposição do ozônio formando espécies radicalares (Golimowski e Golimowska, 1996).

Sendo assim, as amostras foram submetidas à ozonização durante 10 h e extraído-se com solução mista de Na_2CO_3 e NaHCO_3 . Observou-se a presença de picos que também apareciam quando foi usada radiação UV e H_2O_2 . Dessa forma, decidiu-se identificar e quantificar também esses íons. Para obter uma melhor separação dos picos 1 e 2, referentes aos íons acetato e formiato, diminuiu-se a força de eluição. Nesses casos a concentração empregada como eluente foi Na_2CO_3 $1,7 \text{ mmol L}^{-1}$ e NaHCO_3 $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Um cromatograma de uma solução padrão contendo os íons é mostrado na Figura 4.15.

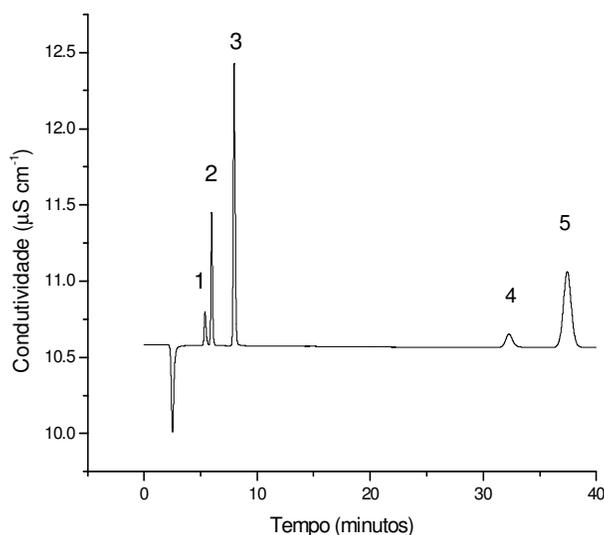


Figura 4.15. Cromatograma de solução padrão contendo $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cada íon. Picos: (1) acetato; (2) formiato; (3) cloreto; (4) fosfato; (5) sulfato.

Na Tabela 4.2 são mostrados os parâmetros analíticos para a determinação de ânions em biodiesel.

Tabela 4.2. Parâmetros analíticos obtidos para a separação e determinação dos ânions acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato em biodiesel. Coluna analítica Metrosep A Supp 5 (4 x 150 mm). Eluente: Na₂CO₃ 1,7 mmol L⁻¹ e NaHCO₃ 0,5 mmol L⁻¹.

Tempos de retenção / minutos	Acetato	Formiato	Cloreto	Fosfato	Sulfato	
	5,38	5,97	7,97	32,27	37,34	
Equação da reta	a / 10 ⁻⁴	-9,7	-54	-57	-176	
Y= a + b C	b / 10 ⁻²	2,30	7,78	17,7	3,53	21,5
R	0,9998	0,9995	0,9997	0,9992	0,9997	
LD / mg kg ⁻¹	0,13	0,19	0,15	0,24	0,14	
LQ / mg kg ⁻¹	0,40	0,56	0,44	0,72	0,44	

a = coeficiente linear, b = coeficiente angular, C = concentração em mg L⁻¹; R = coeficiente de correlação; LD= limite de detecção; LQ= limite de quantificação.

Os resultados obtidos para a determinação dos ânions nas amostras de biodiesel analisadas são mostrados na Tabela 4.3. As amostras de biodiesel de soja foram tratadas para análise por três procedimentos. No primeiro procedimento empregou-se apenas extração líquido-líquido com água; no segundo ozonização e extração com Na₂CO₃ e NaHCO₃ e no terceiro, ozonização associada à irradiação UV e extração com Na₂CO₃ e NaHCO₃. Todos os procedimentos de extração foram assistidos por ultrassom. A Figura 4.16 mostra um cromatograma obtido para biodiesel de soja.

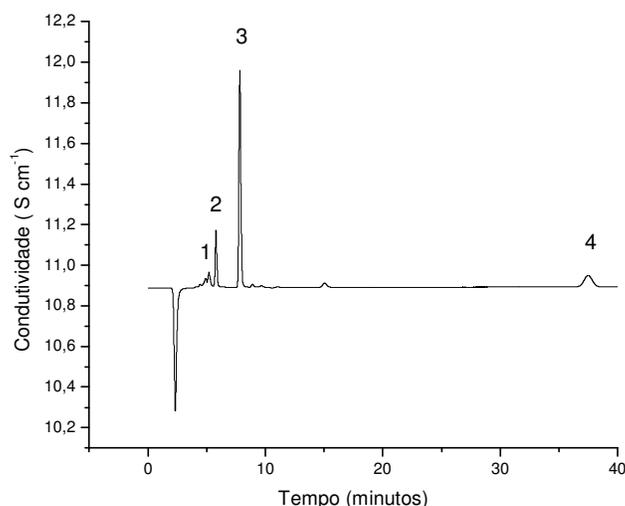


Figura 4.16. Determinação de ânions em biodiesel de soja. Pré-tratamento somente extração em água. Picos: (1) acetato; (2) formiato; (3) cloreto; (4) sulfato.

Tabela 4.3. Concentração (mg kg^{-1}) dos ânions em biodiesel analisados por cromatografia de íons.

Biodiesel	Cloreto /mg kg^{-1}	DPR (%)	Formiato /mg kg^{-1}	DPR (%)	Acetato /mg kg^{-1}	DPR (%)	Sulfato /mg kg^{-1}	DPR (%)
Sebo bovino ^a	0,66	32	<LD	-	0,98	10	<LD	-
Soja bruto ^a	0,56	11	28,5	12	5,16	12	<LD	-
Canola etílica ^a	1,27	15	53,7	4,8	11,5	7,4	0,45	5,6
Soja ^a	1,86	1,4	1,89	3,9	0,51	3,6	0,76	19
Soja ^b	1,66	3,9	2,31	21	1,46	5,8	0,56	18
Soja ^c	1,99	11	317	44	50,1	37	0,73	17

a= apenas extração com água; b= extração após ozonólise; c= extração após ozonólise e radiação UV.

Avaliando os três procedimentos de tratamento de amostras observa-se que as concentrações dos íons cloreto e sulfato não sofrem variação. Sendo assim, os íons cloreto e sulfato podem ser extraídos das amostras de biodiesel por procedimentos simples baseados apenas na extração líquido-líquido assistida por

ultrassom, empregando água como solução extratora. Em relação às amostras submetidas à ozonólise e radiação UV, empregou-se solução de Na_2CO_3 $1,7 \text{ mmol L}^{-1}$ e NaHCO_3 $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ como solução extratora para ajustar o pH para 9,0 e assim favorecer a detecção dos íons fosfato na forma HPO_4^{2-} , pois após a ozonólise, radiação UV e extração em água as amostras apresentavam valores de pH menores que 3,0. Os cromatogramas obtidos para biodiesel de soja após ozonólise e também após radiação UV e ozonólise são mostrados na Figura 4.17.

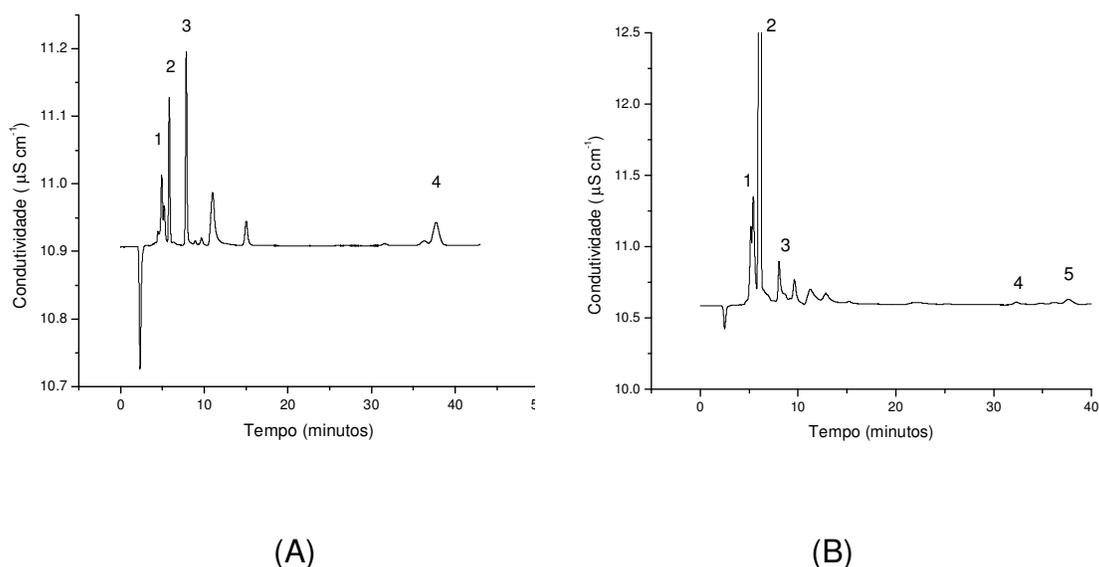


Figura 4.17. Cromatogramas obtidos para biodiesel de soja. A) após ozonólise. Picos: (1) acetato; (2) formiato; (3) cloreto; (4) sulfato. B) após ozonólise + radiação UV. Picos: (1) acetato; (2) formiato; (3) cloreto; (4) fosfato; (5) sulfato.

Observa-se que há um aumento na concentração dos ânions acetato e formiato após o procedimento de ozonólise e este aumento é maior ainda após o uso associado de ozônio e radiação UV. Tal aumento pode ser atribuído a formação dos ácidos fórmico e acético promovido pela fotólise oxidativa. Quando se empregou a radiação UV foi possível identificar também os íons fosfato para a amostra de biodiesel de soja fortificada com fósforo na forma de lecitina ($40,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de fósforo) no entanto, aparece um pico de pequena intensidade, com uma recuperação muito baixa, apenas 3 %. Tais dados indicam que provavelmente não esteja ocorrendo a formação dos íons fosfato através dos procedimentos empregados neste trabalho. Dessa forma, pode-se levantar a hipótese de

formação de outras espécies de fósforo, como por exemplo, o ácido glicerofosfórico que pode ser formado pela reação entre a lecitina e a glicerina que pode estar presente no biodiesel. A estrutura do ácido é mostrada na Figura 4.18.

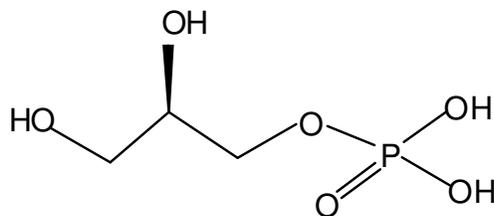


Figura 4.18. Estrutura molecular do ácido glicerofosfórico.

O método de extração aqui proposto apresentou resultados satisfatórios para a determinação dos íons formiato, acetato, cloreto e sulfato em biodiesel. Tal método é interessante, pois se baseia em extração líquido-líquido. Neste procedimento, água é empregada como solvente extrator e o efeito do ultrassom é aumentar a interação do solvente com a matriz da amostra e assim, promover a dissolução dos ânions na fase aquosa.

A determinação dos íons cloreto em biodiesel ainda não é regulamentada pela ANP, no entanto, para o combustível etanol, o teor especificado é de no máximo $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$, pois os íons cloreto podem danificar a camada de óxido de cromo que protege as ligas metálicas da oxidação, que associado a outros fatores pode acarretar na diminuição da vida útil de peças dos veículos (Ferreira *et al.*, 2008). Além disso, ácido clorídrico é comumente usado na indústria de biodiesel na etapa de purificação e ainda, o cloreto pode ser encontrado na matéria-prima empregada na síntese. Dugo *et al.* (2007), determinaram cloreto em óleo de oliva em concentrações na ordem de $18,0 \text{ mg kg}^{-1}$ e Emmenegger e Steinbach (2010) analisaram biodiesel de colza e verificaram um teor de cloreto de $4,9 \text{ mg L}^{-1}$.

Em relação ao enxofre, foi possível quantificar quando presente na forma de íons sulfato. O limite máximo regulamentado pela ANP para enxofre total é de 10 mg kg^{-1} . O enxofre quando presente nas amostras de biodiesel provavelmente estará na forma de sulfato, proveniente do álcool empregado na síntese ou do ácido sulfúrico quando este for empregado como catalisador.

Na análise dos íons formiato e acetato após extração líquido-líquido, sem irradiação UV, conforme mostrado na Tabela 4.3, observou-se que os mesmos estão presentes em concentrações altas nas amostras de biodiesel obtidas de óleo de canola e de soja bruto.

Assim, decidiu-se investigar também a presença destes ânions orgânicos no biodiesel além dos ânions inorgânicos que foram propostos inicialmente. Para tanto, várias análises foram realizadas. Estudos foram realizados por cromatografia de íons. Para melhorar a separação dos íons acetato e formiato foi empregada uma coluna de maior comprimento do tipo Metrosepp Supp 5 (4 x 250 mm), também à base de substrato polimérico funcionalizado com grupamentos de amônio quaternário. Além disso, foram feitas análises das amostras de biodiesel por cromatografia a gás, para a determinação do teor de álcool, e também do teor de ésteres nas amostras e avaliação da estabilidade oxidativa através do método Rancimat, com o objetivo de investigar a presença dos ânions orgânicos.

4.2. Avaliação da presença de ânions orgânicos em biodiesel

4.2.1. Análise em amostras de biodiesel por cromatografia a gás

4.2.1.1. Determinação do teor de álcool residual

O teor de álcool residual foi determinado, por cromatografia a gás segundo o método EN 14110, para as mesmas amostras de biodiesel que foram analisadas por cromatografia de íons (biodiesel de soja, soja bruto, sebo bovino, girassol e canola etílico). O objetivo foi verificar se os íons formiato e acetato presentes nas amostras após foto-oxidação eram provenientes do processo de oxidação do álcool presente no biodiesel.

Todas as amostras analisadas apresentaram teor de álcool menor que 0,05 % m/m, o que mostrou que, em relação ao teor de álcool residual, elas se encontravam dentro do limite especificado pela ANP, que é de no máximo 0,2 % m/m. Dessa forma, pode-se afirmar que os teores elevados de formiato e acetato após a foto-oxidação não são provenientes da oxidação do álcool residual.

4.2.1.2. Determinação do teor de ésteres

As amostras de biodiesel estudadas foram analisadas por cromatografia a gás para a determinação dos ésteres metílicos e etílicos (este último de canola) para verificar a eficiência da reação de transesterificação e principalmente, para verificar alterações na composição das amostras após foto-oxidação por irradiação UV. Os resultados obtidos para o teor de ésteres são mostrados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Composição em porcentagem de ésteres alquílicos das amostras de biodiesel (n=3).

Ésteres	Soja	Soja (UV)	Canola	Canola (UV)	Sebo bovino	Soja bruto
14:0	0,010 ± 0,001	0,094 ± 0,001	0,066 ± 0,001	0,066 ± 0,001	3,79 ± 0,01	0,073 ± 0,002
16:0	10,84 ± 0,001	13,43 ± 0,042	4,67 ± 0,006	4,755 ± 0,017	25,87 ± 0,1	9,649 ± 0,20
16:1	0,090 ± 0,002	0,117 ± 0,004	0,221 ± 0,005	0,227 ± 0,001	5,08 ± 0,02	0,084 ± 0,001
18:0	3,049 ± 0,003	3,739 ± 0,007	2,370 ± 0,002	2,420 ± 0,003	12,11 ± 0,4	3,179 ± 0,007
18:1	28,90 ± 0,57	30,01 ± 0,15	57,16 ± 4,22	54,10 ± 5,34	38,09 ± 0,34	24,89 ± 0,12
18:2	55,17 ± 0,45	43,35 ± 0,099	22,68 ± 0,52	29,21 ± 1,27	0,305 ± 0,001	40,37 ± 0,30
18:3	ND	ND	5,90 ± 0,21	ND	ND	ND
20:0	0,327 ± 0,001	0,505 ± 0,004	1,085 ± 0,001	1,090 ± 1,087	0,141 ± 0,001	0,331 ± 0,001
22:1	ND	ND	0,062 ± 0,002	0,062 ± 0,001	0,065 ± 0,001	ND
22:0	0,448 ± 0,001	0,549 ± 0,007	0,323 ± 0,001	0,338 ± 0,001	ND	0,399 ± 0,002

ND=Não detectado.

Os dados obtidos por cromatografia a gás para o teor de ésteres estão de acordo com a literatura para todas as amostras analisadas (Knothe *et al.*, 2006). Em relação às amostras que passaram por um processo oxidativo (soja UV e canola UV) observa-se que ocorre degradação dos ésteres linolênicos (C18:3) presentes no biodiesel de canola e uma diminuição do teor de ésteres linolênicos (C18:2) do biodiesel de soja.

Estas diferenças na composição dos ésteres após a radiação UV eram esperadas, pois a foto-oxidação é mais rápida do que a auto-oxidação, uma vez que a velocidade relativa da auto-oxidação é de 1 para oleatos (18:1), 27 para linoleatos (18:2) e 77 para linolenatos (18:3), enquanto que para a foto-oxidação é 3×10^4 , 4×10^4 e 7×10^4 , respectivamente (Gungstone *et al.*, 2007). Além disso, os resultados de degradação dos ésteres também estão em acordo com os dados obtidos por Khoury *et al.* (2011) após fotólise oxidativa de biodiesel de diferentes matérias-primas.

Sendo assim, foi confirmada a oxidação dos ésteres pelo processo de irradiação UV e ozonização, que embora não tenha sido eficiente para a conversão dos compostos de fósforo para íons fosfato, comprovou-se que ocorre um processo de degradação da amostra nas condições estudadas. Assim, o aumento nas concentrações dos íons formiato e acetato após ozonização e irradiação UV obtidos por cromatografia de íons pode ser atribuído à formação dos respectivos ácidos carboxílicos, ácido fórmico e acético após a degradação foto-oxidativa (Omonov *et al.*, 2011).

4.2.2. Avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel

Com o objetivo de confirmar a origem dos ânions orgânicos presentes nas amostras de biodiesel, avaliou-se a estabilidade oxidativa das amostras de biodiesel de soja, canola, sebo bovino e soja bruto através do método Rancimat[®].

As Figuras 4.19 a 4.22 apresentam os gráficos com os valores de condutividade em função do tempo para as amostras de biodiesel. Observa-se inicialmente que a condutividade apresenta pouca variação. Porém, a partir de certo momento é observado rápido aumento da condutividade. Este ponto, que é obtido pela interseção das duas retas é chamado de ponto de indução ou período de indução (PInd). Na prática, o PInd corresponde ao tempo que uma amostra resiste ao teste de oxidação. Para as amostras analisadas, o PInd variou de 0,56 h a 6,5 h.

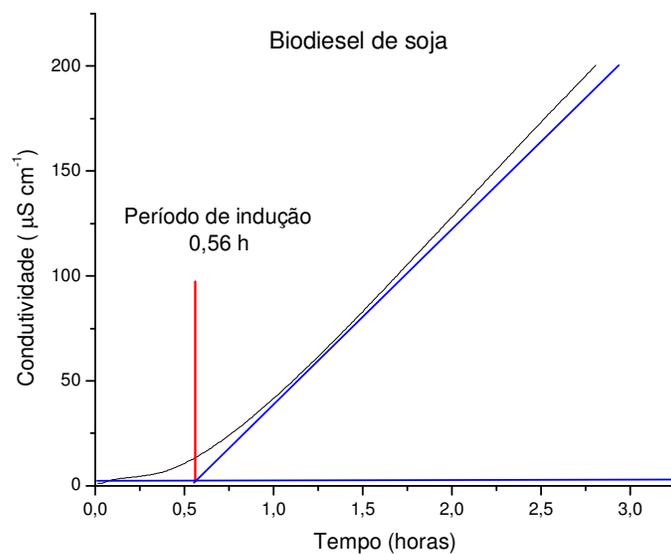


Figura 4.19. *Teste da estabilidade oxidativa para biodiesel de soja.*

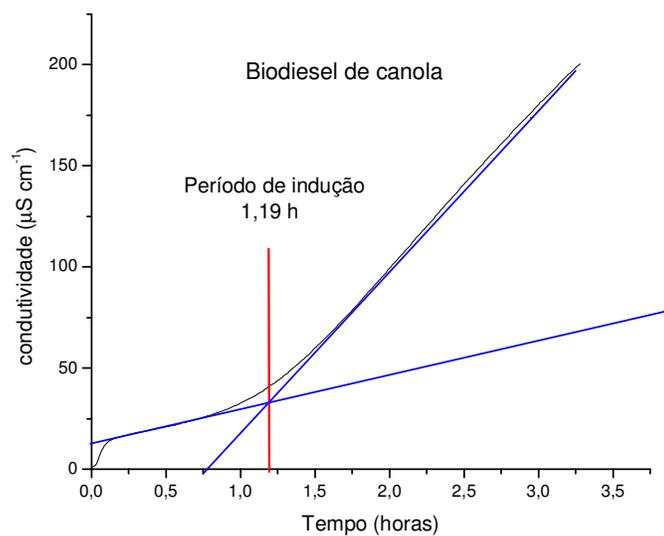


Figura 4.20. *Teste da estabilidade oxidativa para biodiesel de canola.*

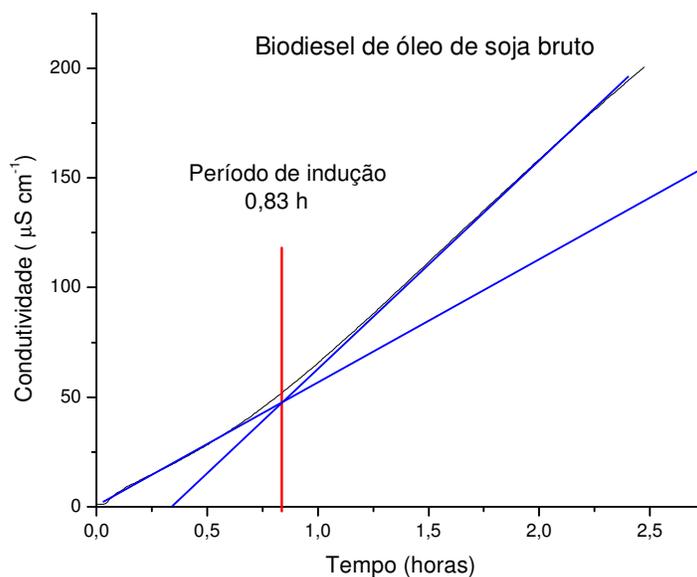


Figura 4.21. *Teste da estabilidade oxidativa para biodiesel de óleo de soja bruto.*

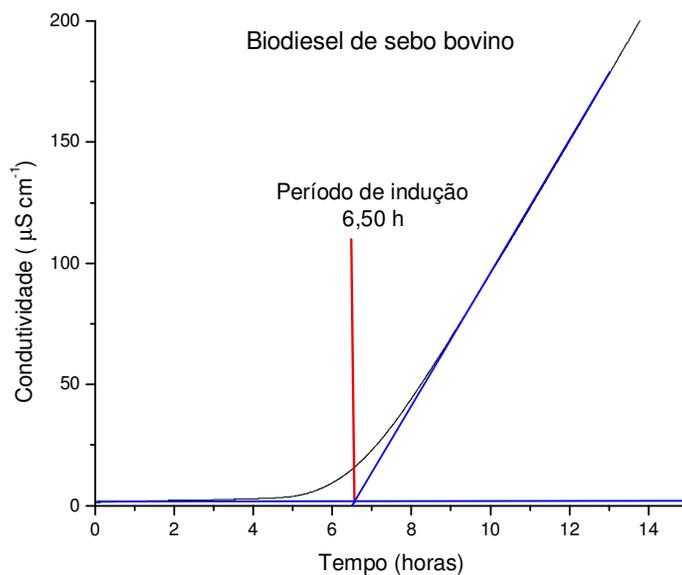


Figura 4.22. *Teste da estabilidade oxidativa para biodiesel de sebo bovino.*

Os testes da estabilidade oxidativa para as amostras de biodiesel estudadas mostram que apenas o biodiesel de sebo apresentou uma estabilidade dentro do limite estabelecido pela ANP, de no mínimo 6 h de período de indução.

Dentre as principais implicações do processo de auto-oxidação¹ do biodiesel destaca-se o aumento da viscosidade e elevação da acidez, causando a formação de gomas insolúveis e sedimentos que provocam o entupimento dos filtros de combustível (Knothe, 2007; Monyem e Gerpen, 2001).

A reação de auto-oxidação ocorre em cadeia e envolve três etapas: iniciação, propagação e finalização. As etapas de iniciação e propagação dependem essencialmente da facilidade com que os hidrogênios nas posições alílicas ou bis-alílicas podem ser removidos das cadeias dos ácidos graxos. A natureza exata da etapa de iniciação ainda não é completamente conhecida. O que se sabe é que a presença de hidroperóxidos originados devido às más condições de estocagem (por exemplo, disponibilidade do ar) e/ou processamento (aquecimento) do combustível, assim como a presença de traços de metais são os principais responsáveis pela iniciação destas reações. Na presença de ar, os radicais alquílicos formados na etapa de iniciação são convertidos a peróxi-radicais na etapa de propagação. A conversão destes peróxi-radicais a hidroperóxidos é a etapa determinante da velocidade da reação, a qual ocorre enquanto houver reagentes e com conseqüente formação de compostos estáveis na etapa de finalização.

¹Neste trabalho, será empregado o termo auto-oxidação por convenção, pois é um termo comumente empregado na área, no entanto para que a auto-oxidação aconteça há a necessidade da presença de oxigênio, na nossa opinião seria mais adequado empregar o termo oxidação.

A Figura 4.23 ilustra o mecanismo geral da oxidação de um ácido graxo, onde I^\bullet representa um iniciador da reação e R^\bullet um radical alquila.

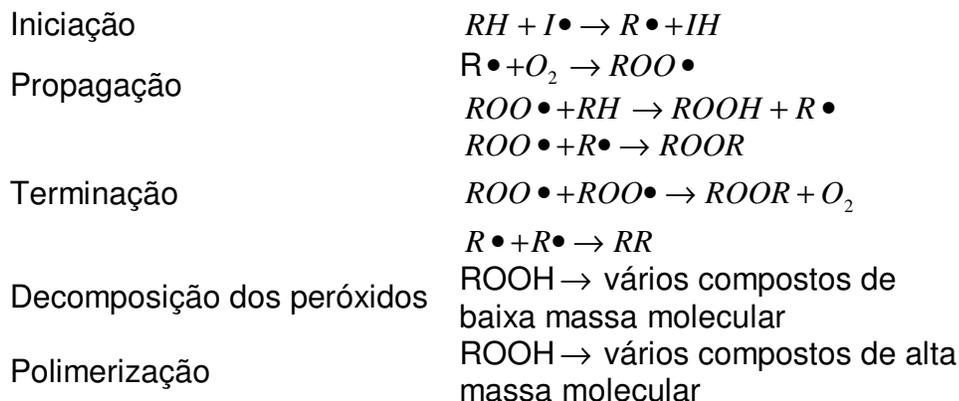
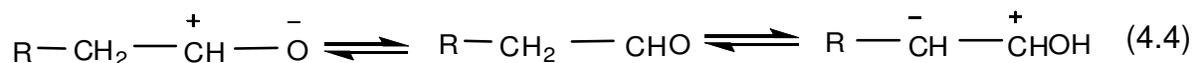


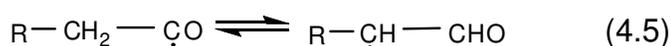
Figura 4.23. Mecanismo geral de oxidação de um ácido graxo.

Os produtos primários da auto-oxidação são hidroperóxidos alílicos, os quais podem polimerizar com outros radicais produzindo compostos de alta massa molecular e gomas (Nogueira, 2011; Knothe, 2007; Knothe *et al.*, 2006; Gungstone, 2007). Compostos de baixa massa molecular são formados pela decomposição dos hidroperóxidos, como por exemplo, ácido fórmico e outros ácidos de baixa massa molecular (Nogueira, 2011; Kamal-Eldin e Pokórny, 2005; Silva *et al.*, 1999).

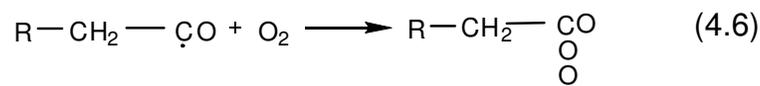
A formação de ácido fórmico como produto da auto-oxidação de óleos vegetais foi proposta por Loury (1972) que sugeriu que o ácido fórmico é formado pela peroxidação de aldeídos. Um equilíbrio em ressonância é estabelecido entre duas formas limitantes de uma molécula de aldeído



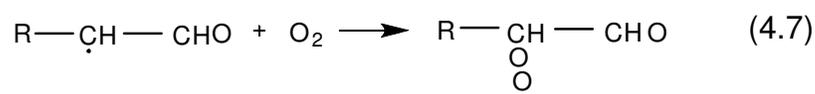
ou mais exatamente entre duas formas limitantes do radical livre carbonila iniciando a reação:



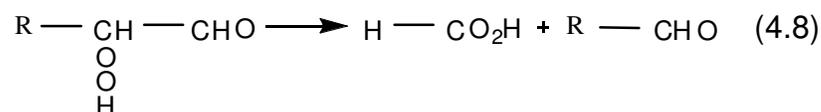
O primeiro híbrido produz um radical perácido livre por auto-oxidação, e por transferência de cadeia forma o perácido:



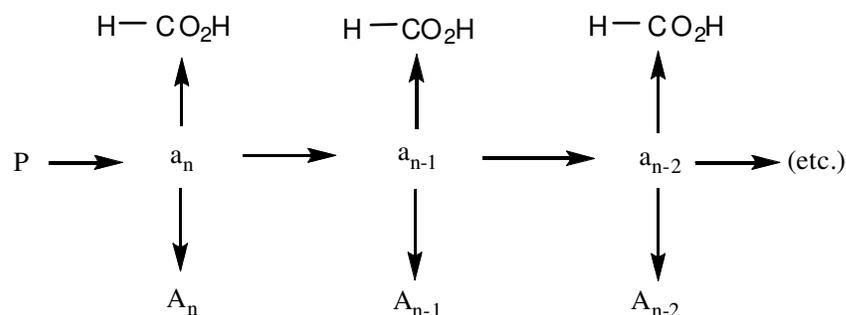
O segundo híbrido é capaz de prender o oxigênio no carbono- α para produzir o aldeído α -hidroperóxido por um mecanismo similar:



Por último se observa a formação de ácido fórmico e um novo aldeído pelo rompimento da ligações O-O e C-C:



O mecanismo da reação recorrente de formação de aldeídos e ácidos orgânicos de baixa massa molecular é mostrado na Figura 4.24. Os aldeídos produzidos pela quebra dos hidroperóxidos gerarão novos hidroperóxidos a partir da disponibilidade de oxigênio. Os hidroperóxidos formados tendem a novamente quebrar, gerando um novo aldeído – de cadeia menor (n-1) e uma molécula do ácido fórmico.



P = hidróperóxido do ácido oleico

a_n = aldeído da cisão, e.g., octanal, nonanal ou decanal

a_n, a_{n-1}, a_{n-2} = aldeídos de menor cadeia

A_n, A_{n-1}, A_{n-2} = ácidos

n = número de carbonos

Figura 4.24. Formação dos compostos orgânicos de baixa massa molecular a partir da reação recorrente dos hidróperóxidos. (Adaptado de Loury, 1972).

O ácido fórmico é a espécie majoritária formada pela quebra dos aldeídos de baixa massa molecular, conforme mostrado no mecanismo de oxidação da Figura 4.24. No trabalho realizado por DeMan *et al.* (1987) sobre a auto-oxidação de óleos e gorduras, foi observado que os ácidos voláteis produzidos pelo processo oxidativo eram compostos principalmente por ácido fórmico e quantidades significantes de ácido acético.

Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho por cromatografia de íons para as concentrações dos íons formiato mostrados na Tabela 4.3 são concordantes com a baixa estabilidade oxidativa apresentada pelas amostras de biodiesel analisadas. A concentração do íon formiato é mais alta do que a dos íons acetato para todas as amostras, corroborando que o ácido fórmico é o principal produto da auto-oxidação do biodiesel. Além disso, em relação aos testes de estabilidade oxidativa, mostrados nas Figuras 4.19 a 4.23 apenas a amostra de biodiesel de sebo bovino apresentou um período de indução maior do que 6 h sendo a única a apresentar concentração do íon formiato abaixo do limite de detecção do método. Estes resultados indicam que há uma correlação entre o teor dos íons acetato e formiato nas amostras de biodiesel com o grau de oxidação do biodiesel, uma vez que os íons acetato e formiato estavam presentes em todas as

amostras de biodiesel, exceto no biodiesel proveniente do sebo bovino, para a qual não foi detectado o íon formiato. No entanto, estudos mais aprofundados não foram realizados, pois estavam fora do objetivo deste trabalho.

Os resultados obtidos por cromatografia de íons e a comparação com a estabilidade oxidativa das amostras de biodiesel permitem afirmar que os íons acetato e formiato presentes nas amostras de biodiesel são provenientes dos produtos da auto-oxidação deste combustível. Os testes com oxidação por radiação UV também complementam esta hipótese da origem dos ânions orgânicos, uma vez que as amostras preparadas para análise por cromatografia de íons por extração líquido-líquido sem o procedimento de radiação UV apresentavam valores de pH de aproximadamente 5,0, e após a oxidação UV observou-se uma diminuição do pH das amostras de pelo menos duas unidades e um aumento considerável das concentrações de acetato e formiato.

Este aumento da acidez das amostras após a radiação UV pode ser atribuído à formação dos respectivos ácidos carboxílicos já citados e o aumento dos teores de acetato e formiato é justificado pelo fato da foto-oxidação ocorrer em velocidades muito maiores do que a auto-oxidação.

Os efeitos da presença desses ânions orgânicos provenientes da oxidação no biodiesel ainda não estão bem estudados e, portanto, não há muitos trabalhos na literatura que tratem da quantificação desses ânions. Recentemente foi desenvolvido por Nogueira e Lago (2011) um trabalho onde foram quantificados em biodiesel os íons formiato e acetato, além de outros analitos, por eletroforese capilar. E embora, estes ânions orgânicos não tenham os seus limites regulamentados para biodiesel, percebe-se que é de grande importância o estudo a cerca da presença destes em biodiesel, pois podem fornecer informações relevantes sobre o grau de oxidação desse combustível.

4.3. Avaliação da formação do ácido glicerofosfórico após Irradiação UV

4.3.1. Digestão por radiação UV empregando tubos de quartzo

Após a realização de vários testes por irradiação UV, testou-se um outro procedimento no qual a lâmpada de vapor de mercúrio empregada como fonte de UV foi posicionada embaixo do tubo de quartzo (contendo a amostra) a 5 cm de distância do mesmo. Acoplado ao tubo colocou-se um condensador para refluxo para promover o resfriamento da amostra e evitar o aquecimento em excesso. Com este sistema, preparou-se novamente as amostras de lecitina de soja, biodiesel de soja e um padrão de éster metílico para análise por cromatografia de íons.

A amostra de lecitina de soja foi analisada empregando este procedimento de preparo de amostra, seguido de análise por cromatografia de íons para avaliar se a oxidação de fósforo a íons fosfato ocorria de modo quantitativo. Aproximadamente 0,01 g ($\pm 0,00001$ g) de lecitina de soja foram pesados diretamente nos tubos de quartzo e adicionados 1,0 mL de H₂O₂. A mistura foi submetida à irradiação UV por 2 h e visualmente observou-se que havia ocorrido digestão completa da amostra. Transferiu-se a solução resultante após a digestão para um balão de 25,0 mL e completou-se o volume com água desionizada. Antes da análise cromatográfica fez-se uma diluição de 1:10 (v/v) com água desionizada. Dessa forma, foi possível quantificar o teor de fósforo em lecitina de soja e o resultado obtido para a análise em triplicata foi de $23,9 \pm 1,8$ mg g⁻¹, correspondendo a 2,39 % de fósforo na amostra. A Figura 4.25 mostra um cromatograma obtido para uma amostra de lecitina de soja com pré-tratamento por irradiação UV.

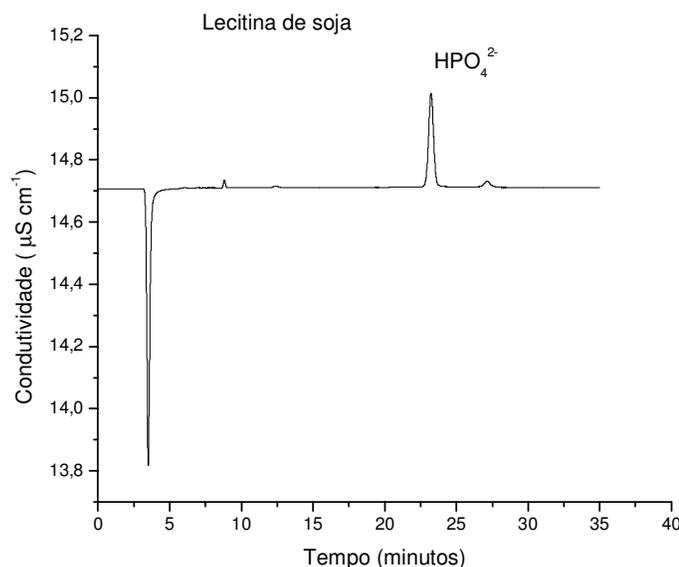


Figura 4.25. Cromatograma obtido para uma amostra de lecitina de soja com concentração de $3,23 \text{ mg L}^{-1}$ de fosfato.

O procedimento foi aplicado também para o éster padrão, linoleato de metila e para amostras de biodiesel de soja. Analisou-se amostras de biodiesel de soja sem e com adição de fósforo na forma de lecitina de soja. As Figuras 4.26 e 4.27 mostram os cromatogramas obtidos para as amostras de biodiesel de soja sem e com lecitina após irradiação UV.

Observa-se que para a amostra na qual não adicionou-se a lecitina não foi detectado o pico referente ao fosfato que deveria aparecer num tempo de retenção de aproximadamente 23 minutos. Para a amostra de biodiesel a qual se adicionou lecitina é possível identificar o pico do fosfato, embora a concentração é muito abaixo da esperada, indicando uma recuperação de 32 %, mostrando que a oxidação com radiação UV não foi eficiente na conversão das espécies de fósforo. No entanto, os dois picos iniciais, referentes aos íons acetato e formiato, respectivamente aparecem em concentrações muito altas, o que provoca inclusive uma contaminação da coluna cromatográfica por estes ânions, principalmente o ânion formiato.

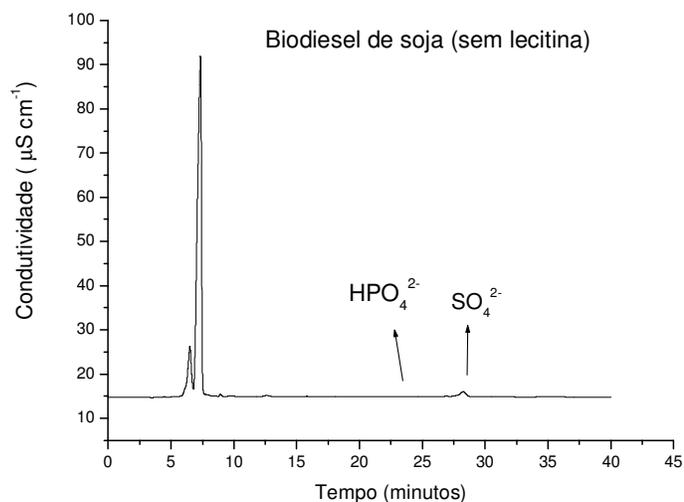


Figura 4.26. Cromatograma obtido para uma amostra de biodiesel de soja após irradiação UV.

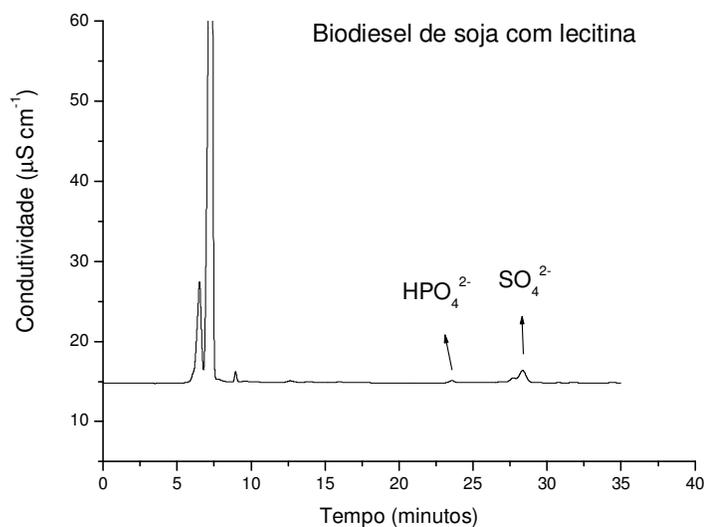


Figura 4.27. Cromatograma obtido para uma amostra de biodiesel de soja com adição de lecitina após irradiação UV- concentração de fosfato $0,972 \text{ mg L}^{-1}$.

Analisou-se também o padrão de éster, cuja solução foi preparada do mesmo modo que a amostra, no entanto, com uma concentração mais alta de fósforo. O cromatograma do éster está ilustrado na Figura 4.28.

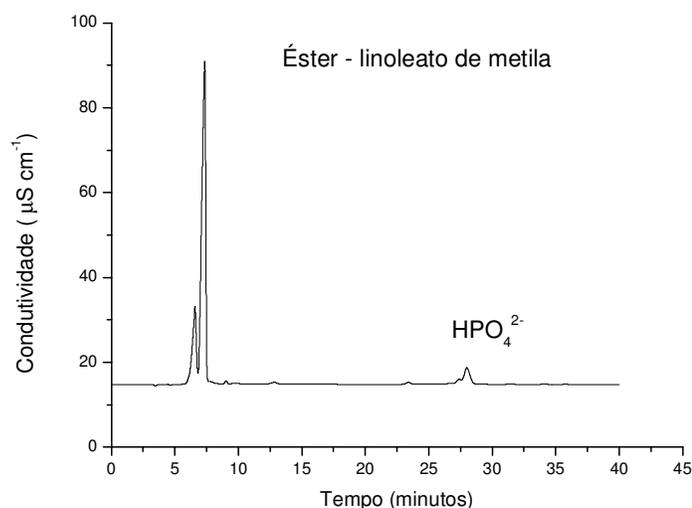


Figura 4.28. Cromatograma obtido para o éster linoleato de metila após irradiação UV – concentração de fosfato $4,33 \text{ mg L}^{-1}$.

A análise do éster também apresentou uma recuperação baixa, de 27,8%. Os resultados obtidos empregando o procedimento por irradiação UV de maneira geral apresentaram valores muito baixos para os testes de recuperação, o que leva a sugerir que haja a formação de outros compostos contendo fósforo e este não esteja na forma do íon fosfato, espécie detectável por cromatografia de íons. No caso do linoleato de metila, em princípio não há glicerina, no entanto, o padrão de éster utilizado com grau de pureza 98,5 % pode conter glicerina mesmo em baixas concentrações, e possivelmente promovendo assim a formação do ácido glicerofosfórico.

Assim, conforme já mencionado os testes de oxidação por irradiação UV indicam a possibilidade de formação do ácido glicerofosfórico e análises por espectrometria de massas foram realizadas para identificação desse composto.

4.3.2. Análises por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)

As amostras de biodiesel de soja preparadas por irradiação UV e extração líquido-líquido com água, foram analisadas por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para verificar a formação do ácido glicerofosfórico durante o processo de irradiação.

Na técnica ESI-MS as moléculas da amostra são ionizadas e os íons são transferidos para a fase gasosa na forma de um spray. A razão massa/carga (m/z) de cada íon é determinada pelo analisador. Quando o íon atinge o detector é gerado um sinal elétrico que é registrado. A ESI pode ser utilizada sem separação cromatográfica identificando-se os analitos por espectrometria de massas. Na ionização por eletrospray no modo positivo, a substância de interesse é acidificada, formando moléculas protonadas. Esta solução é nebulizada através de um tubo capilar onde se aplica uma alta voltagem. De forma análoga, pode-se utilizar uma solução básica e um potencial negativo no capilar para se produzir íons negativos (Herberth e Jongstone, 2003; Hoffman e Stroobant, 2007).

O ácido glicerofosfórico pode se apresentar nas formas ácido α -glicerofosfórico e ácido β -glicerofosfórico. A conversão de uma forma do ácido na outra pode ocorrer via intermediário com anel de cinco membros, como mostrado na Figura 4.29 (Corbridge, 1990).

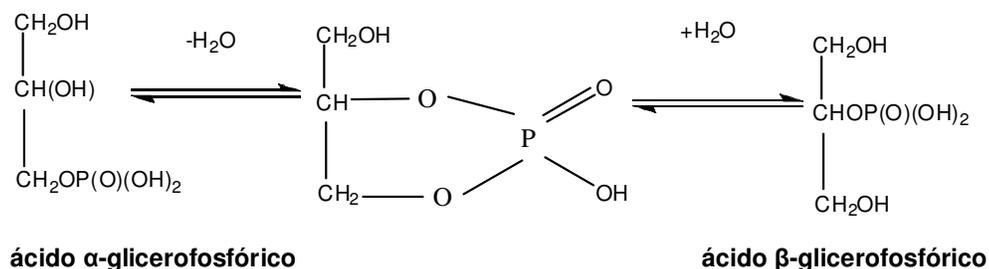


Figura 4.29. Esquema da interconversão do ácido glicerofosfórico (Corbridge, 1990).

Os ácidos glicerofosfóricos podem ser oxidados aos ácidos fosfoglicéricos, os quais também estão em equilíbrio onde há estrutura em anel semelhantemente ao visto na Figura 4.29. A desidratação do ácido β -fosfoglicérico produz o ácido fosfoenolpirúvico por uma reação livremente reversível de grande importância em sistemas biológicos (Corbridge, 1990), conforme mostrado na Figura 4.30.

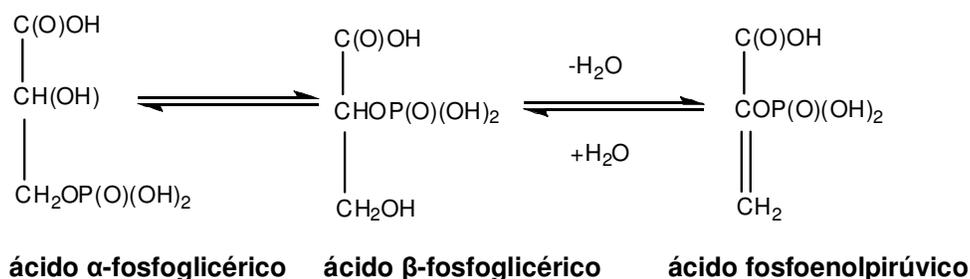


Figura 4.30. Reação de desidratação do ácido fosfoglicérico produzindo ácido fosfoenolpirúvico (Corbridge, 1990).

O ácido glicerofosfórico tem fórmula molecular $\text{C}_3\text{H}_9\text{O}_6\text{P}$ e massa molecular de 172,07 Dalton. Em testes iniciais empregou-se os modos positivo e negativo. Observou-se que no modo positivo ocorria uma melhor ionização e identificou-se que o ácido glicerofosfórico ioniza melhor no modo positivo e apresenta um sinal no valor de m/z correspondente a 173.

Os espectros das amostras estão mostrados nas Figuras 4.31 a 4.36 e correspondem às análises realizadas no modo positivo, ESI (+) MS, onde foi possível identificar a presença do ácido glicerofosfórico nas amostras de biodiesel de soja contaminadas com fósforo (10 mg kg^{-1}) na forma de lecitina de soja.

Primeiramente analisou-se o branco das amostras que foi preparado pela diluição de 1,0 mL H_2O_2 30 % v/v em balão de 25 mL, completando o volume com água desionizada.

Observa-se na Figura 4.31 que não foi identificado o sinal referente ao ácido glicerofosfórico ($m/z=173$), indicando que o reagente H_2O_2 utilizado no preparo da amostra não contém o analito em questão.

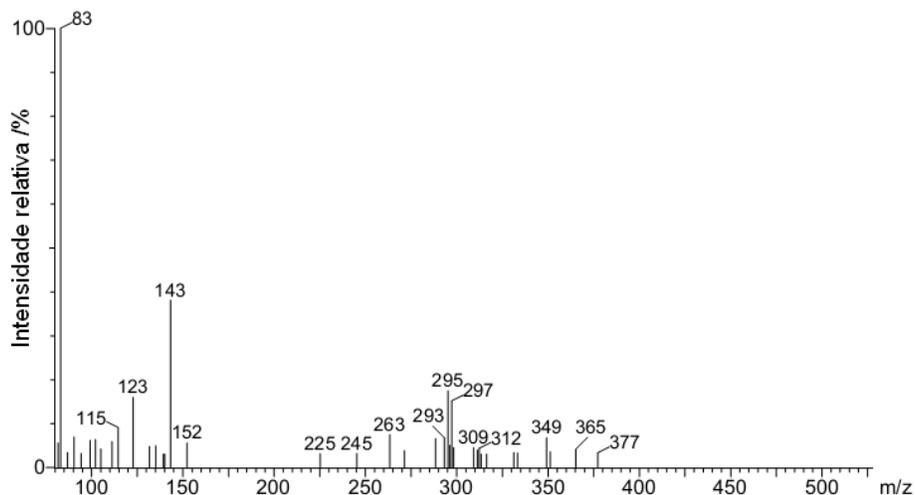


Figura 4.31. ESI (+) MS do branco (solução de peróxido de hidrogênio 30 %).

Na sequência foram analisadas amostras de lecitina de soja submetidas à irradiação UV, e também amostras de biodiesel de soja e de um padrão de éster, o linoleato de metila. Estas últimas foram igualmente submetidas à irradiação UV seguindo extração líquido-líquido. Os espectros obtidos são mostrados nas Figuras 4.32 a 4.36.

Na Figura 4.32 que corresponde ao espectro da lecitina de soja, amostra na qual foi possível a quantificação dos íons fosfato por cromatografia de íons, conforme já mostrado, não foi identificada a presença do ácido glicerofosfórico. Isso confirma que o procedimento empregado no preparo de amostras de lecitina de soja por irradiação UV mostrou-se eficiente na conversão das espécies de fósforo presentes na lecitina para a forma de fosfato.

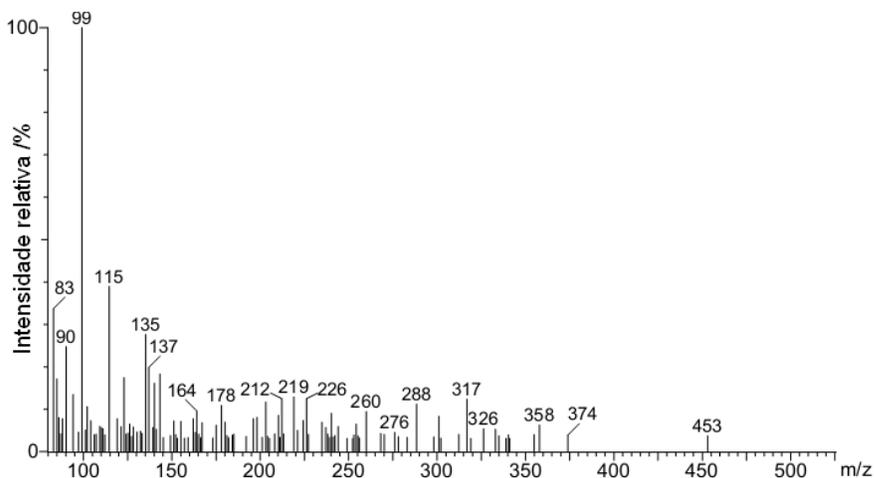


Figura 4.32. ESI (+) MS da amostra de lecitina de soja.

A Figura 4.33 mostra o espectro ESI-MS obtido para a amostra de biodiesel de soja sem adição de lecitina de soja e submetida apenas ao procedimento de extração líquido-líquido, ou seja, sem irradiação UV. Observa-se que não foi identificada a presença do ácido glicerofosfórico.

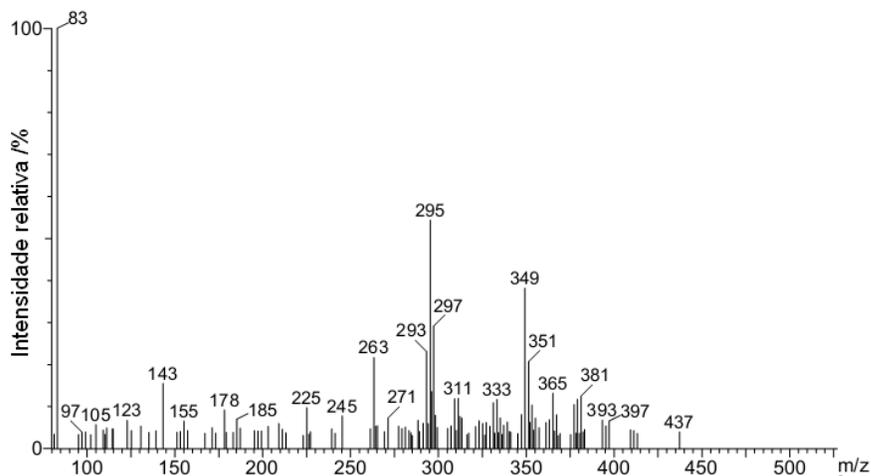


Figura 4.33. ESI (+) MS de biodiesel de soja, sem lecitina e sem irradiação UV.

O espectro de ESI-MS obtido para a amostra de biodiesel de soja submetida à irradiação UV seguido de extração líquido-líquido está mostrado na Figura 4.34. É possível perceber que o ácido glicerofosfórico também não foi

identificado para a amostra de biodiesel de soja sem adição de lecitina, mesmo com o tratamento da amostra com radiação UV.

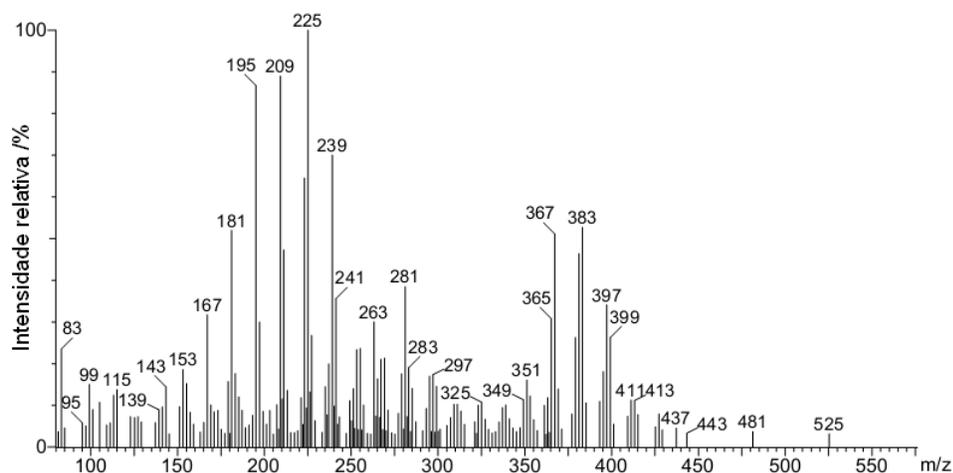


Figura 4.34. *ESI (+) MS de biodiesel de soja, sem lecitina e com irradiação UV.*

A Figura 4.35 mostra o espectro obtido para a amostra de biodiesel de soja fortificada com fósforo (10 mg kg^{-1}) na forma de lecitina de soja. Nesse caso, é possível perceber o sinal ($m/z=173$) referente ao ácido glicerofosfórico. Tal resultado confirma que a baixa recuperação para os íons fosfato obtida por cromatografia de íons deve-se principalmente à formação do ácido glicerofosfórico.

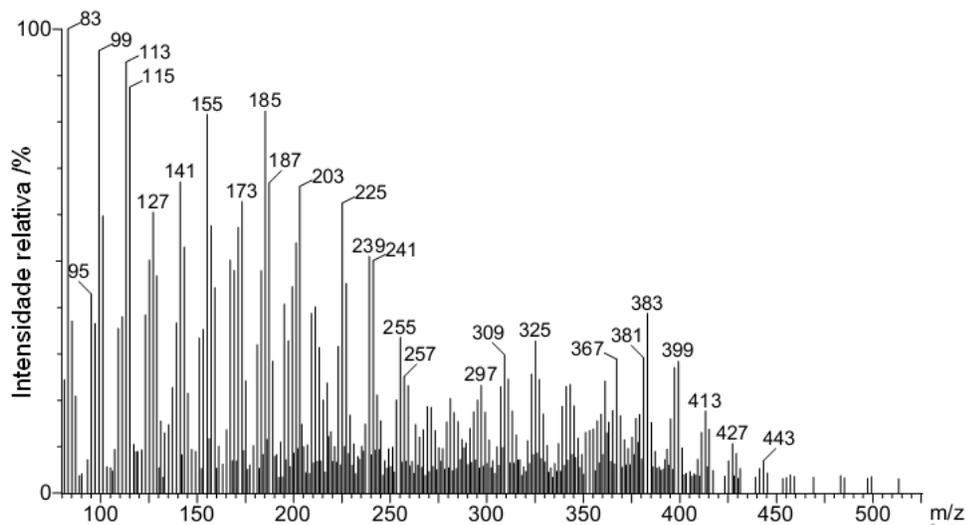


Figura 4.35. *ESI (+) MS de biodiesel de soja, com lecitina e irradiação UV.*

Ainda, para confirmar a formação do ácido glicerofosfórico, analisou-se além das amostras de biodiesel, um padrão de éster, o linoleato de metila, para avaliar a possibilidade de interferência da matriz, uma vez que o biodiesel é uma matriz mais complexa. O espectro mostrado na Figura 4.36 indica a presença do sinal ($m/z=173$) referente ao ácido glicerofosfórico também no padrão de éster.

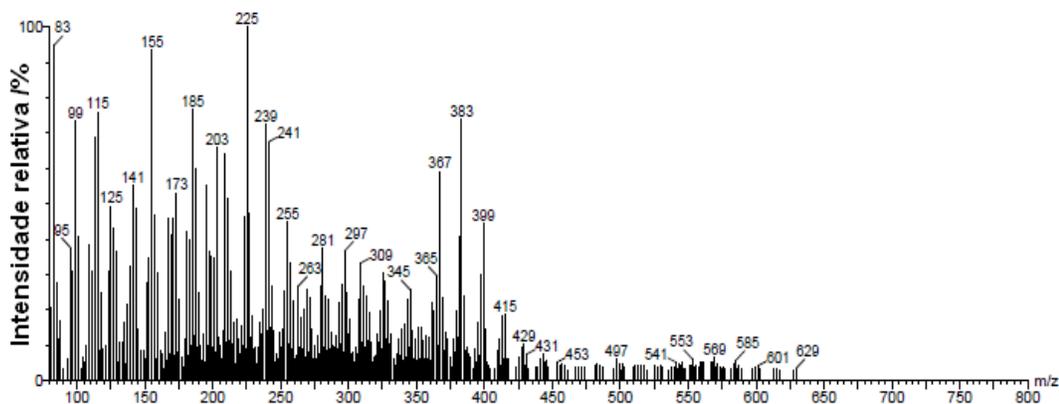


Figura 4.36. ESI (+) MS de éster linoleato de metila com lecitina e irradiação UV.

Tentou-se ainda verificar se há correlação entre a intensidade do sinal verificado e o teor de ácido glicerofosfórico formado. Para tanto, fortificou-se amostras de biodiesel de soja em cinco diferentes concentrações de fósforo, na forma de lecitina de soja. Os resultados são mostrados na Figura 4.37. Foram analisadas amostras contendo 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 mg kg^{-1} .

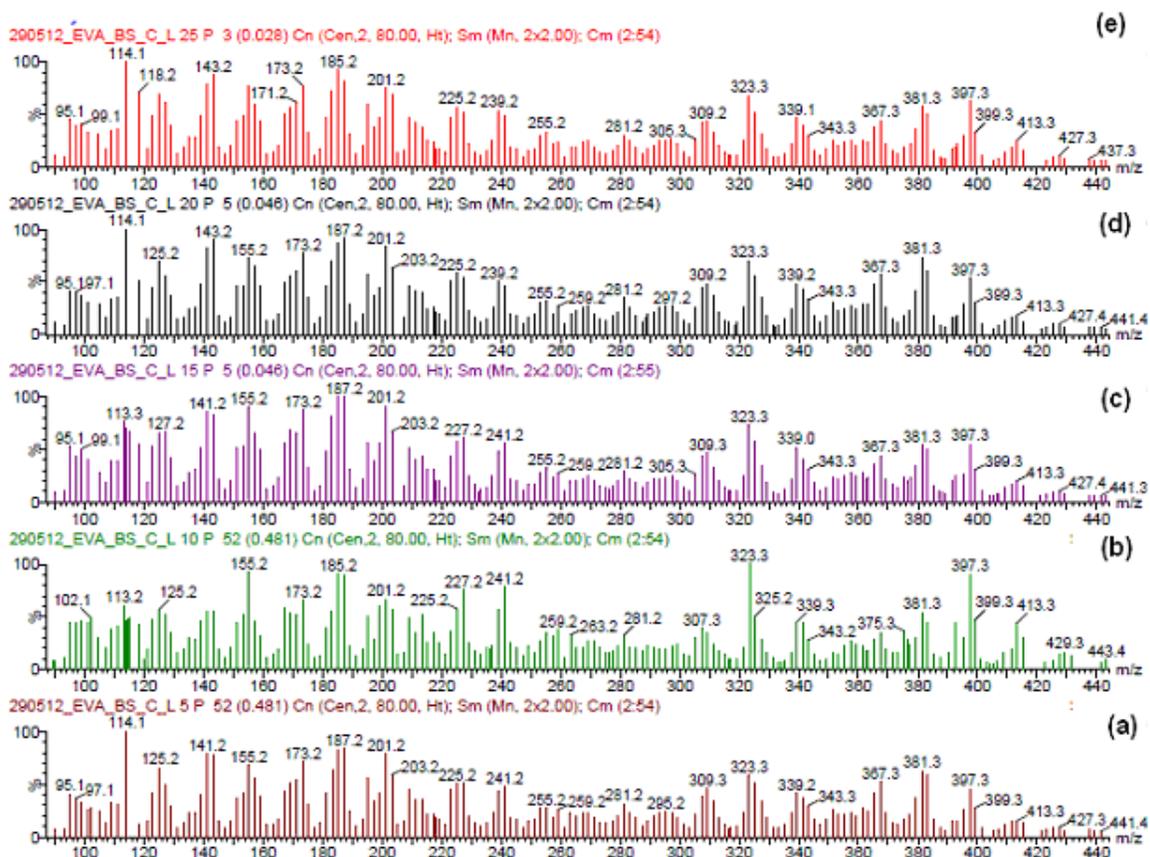


Figura 4.37. Espectro ESI (+) MS obtido para amostras de biodiesel fortificadas com lecitina de soja. (a) 5,0 mg kg⁻¹ de fósforo; (b) 10,0 mg kg⁻¹ de fósforo; (c) 15,0 mg kg⁻¹ de fósforo; (d) 20,0 mg kg⁻¹ de fósforo e (e) 25,0 mg kg⁻¹ de fósforo.

Observa-se que em todas as amostras aparece o sinal referente ao ácido glicerofosfórico (m/z=173). Tentou-se correlacionar a área obtida pela integração do sinal do ácido glicerofosfórico com a concentração de fósforo para verificar se havia linearidade na formação do ácido glicerofosfórico. A integração dos sinais está mostrado na Figura 4.38.

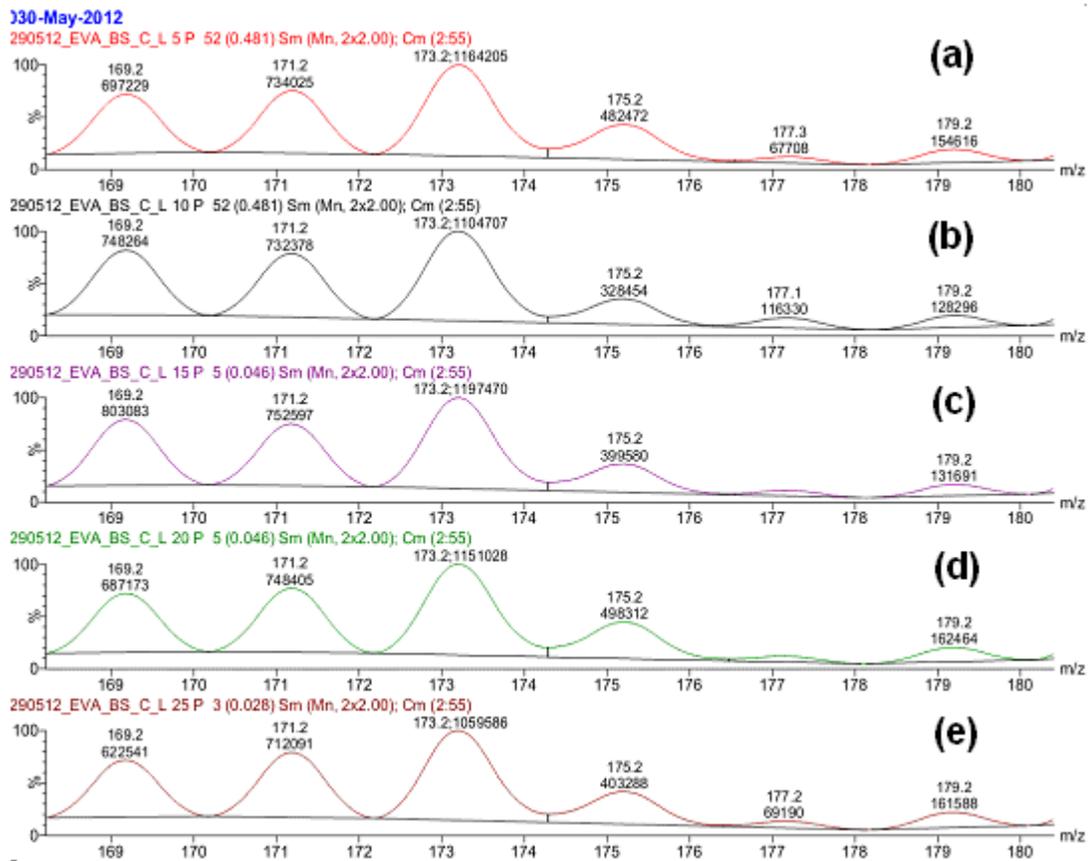


Figura 4.38. Integração dos sinais obtidos por ESI (+) MS para amostras de biodiesel em diferentes concentrações de fósforo: (a) 5,0 mg kg⁻¹; 10,0 mg kg⁻¹; 15,0 mg kg⁻¹; 20,0 mg kg⁻¹ e 25,0 mg kg⁻¹.

Na Figura 4.39 é mostrado um gráfico da correlação entre os valores de área dos sinais do ácido glicerofosfórico e as concentrações de fósforo.

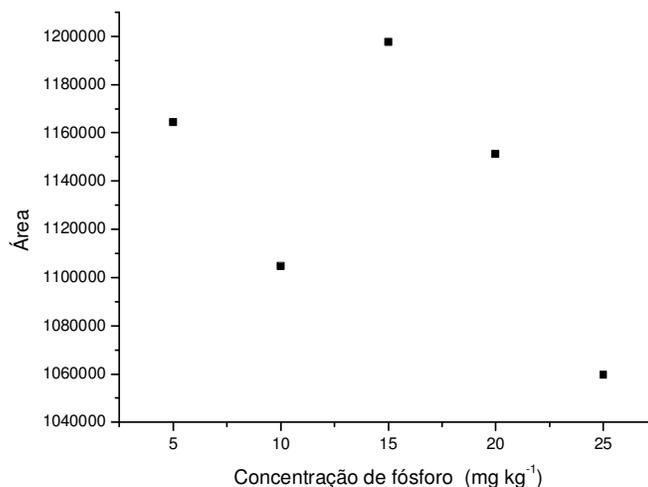


Figura 4.39. *Correlação entre a concentração de fósforo em biodiesel e a área do sinal ESI (+) MS do ácido glicerofosfórico.*

Observa-se que não há correlação entre a concentração de fósforo presente no biodiesel e a quantidade de ácido glicerofosfórico formado durante o processo oxidativo por irradiação UV. Isto está de acordo com a baixa e variável recuperação do fosfato obtida por cromatografia de íons.

Apesar dos testes empregando a radiação ultravioleta não terem apresentado eficiência para a formação de íons fosfato, o que permitiria a determinação de fósforo total em biodiesel por cromatografia de íons, eles despertaram a nossa atenção por levarem a altos resultados nos valores das concentrações para os íons orgânicos formiato e acetato. A investigação da origem dos mesmos na amostra tratada possibilitou que pudéssemos perceber que há ligação entre a presença destes no biodiesel com a estabilidade oxidativa do mesmo.

4.4. Determinação de acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato em biodiesel por cromatografia de íons

4.4.1. Validação do método

O método proposto para a determinação dos ânions orgânicos e inorgânicos em amostras de biodiesel foi validado em termos da linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

4.4.1.1. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através do coeficiente de correlação linear. As curvas analíticas para todos os ânions em estudo foram obtidas pela correlação entre a área do pico ($(\mu\text{S cm}^{-1}) \text{ min}$) e a concentração do analito (mg L^{-1}). Todos os coeficientes das regressões lineares apresentaram valores maiores que 0,998. A Figura 4.40 apresenta um cromatograma padrão obtido para os ânions acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato.

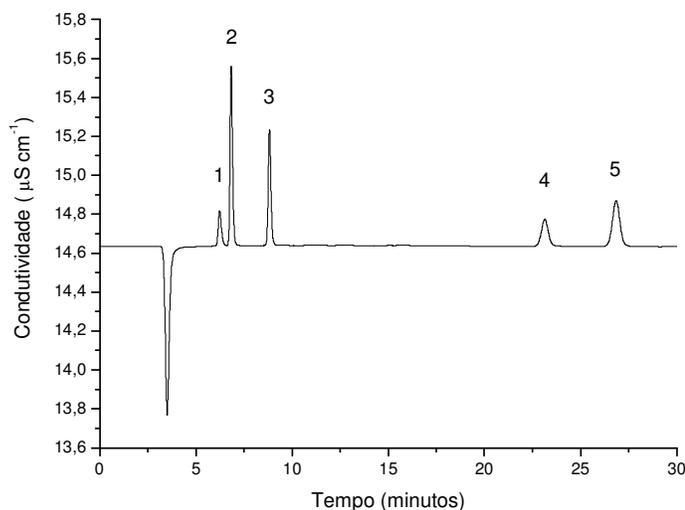


Figura 4.40. Cromatograma padrão. Picos: (1) acetato ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$); (2) formiato ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$); (3) cloreto ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$); (4) fosfato ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$); (5) sulfato ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$).

As Figuras 4.41 a 4.45 ilustram as curvas analíticas obtidas a partir dos padrões analíticos para os ânions em estudo.

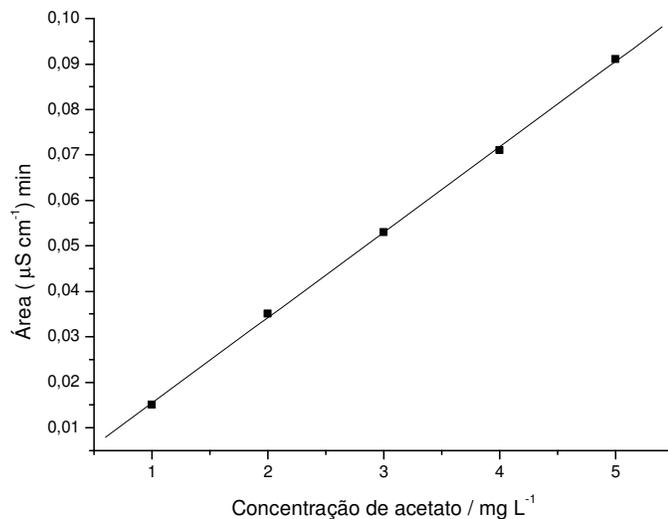


Figura 4.41. Curva analítica obtida para o íon acetato. Faixa de concentração: 1,0 a 5,0 mg L⁻¹.

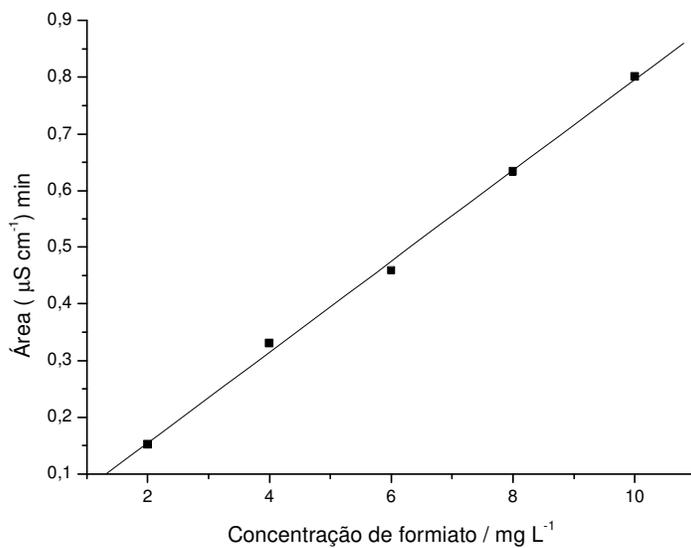


Figura 4.42. Curva analítica obtida para o íon formiato. Faixa de concentração: 2,0 a 10,0 mg L⁻¹.

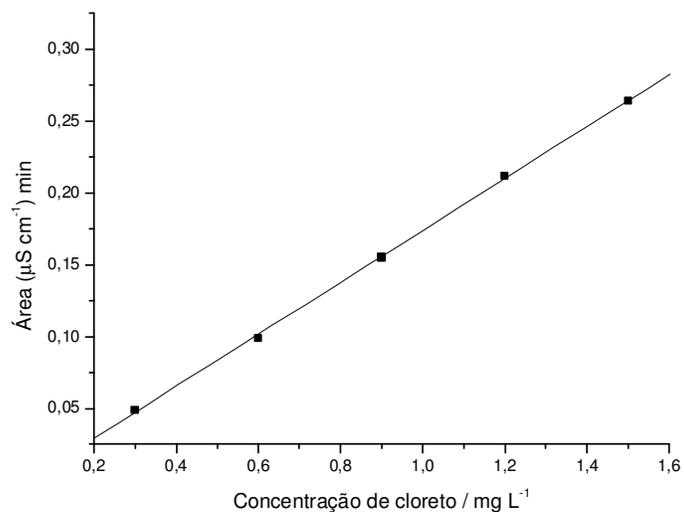


Figura 4.43. Curva analítica obtida para o íon cloreto. Faixa de concentração: 0,3 a 1,5 mg L⁻¹.

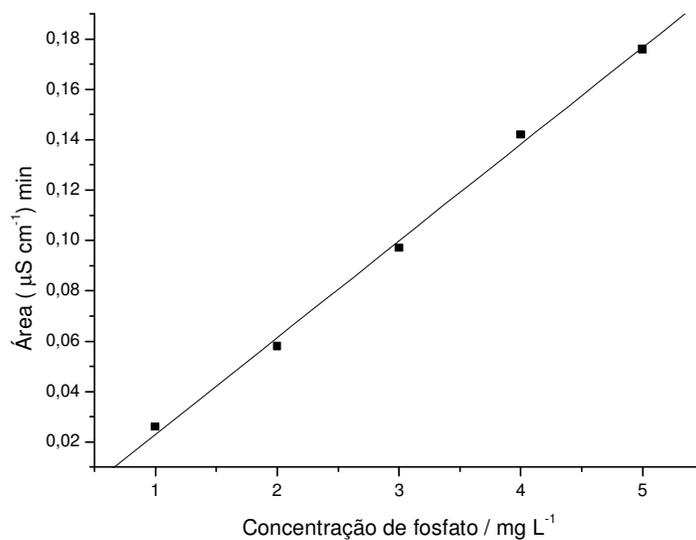


Figura 4.44. Curva analítica obtida para o íon fosfato. Faixa de concentração: 1,0 a 5,0 mg L⁻¹.

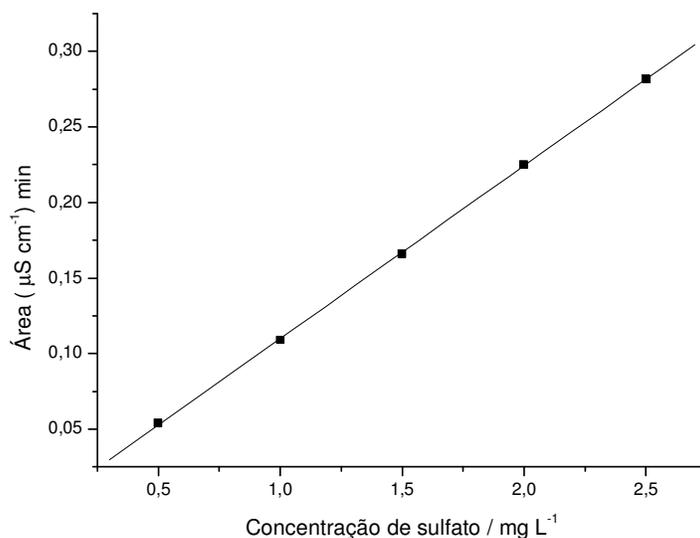


Figura 4.45. Curva analítica obtida para o íon sulfato. Faixa de concentração: 0,5 a 2,5 mg L⁻¹.

4.4.1.2. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados considerando $LD = 3,3 S/b$ e $LQ = 10 S/b$, onde “S” corresponde à estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão e “b” é a inclinação da curva analítica (Ribani *et al.*, 2004; INMETRO, 2010). Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Parâmetros analíticos obtidos para a separação e determinação dos ânions em biodiesel. Coluna analítica Metrosep A Supp 5 (4 x 250 mm). Eluente: Na_2CO_3 3,2 mmol L⁻¹ e NaHCO_3 1,0 mmol L⁻¹.

Tempos de		Acetato	Formiato	Cloreto	Fosfato	Sulfato
retenção / minutos		6,21	6,83	8,83	22,82	26,46
Equação da reta Y= a + b C	a / 10 ⁻³	3,4	-5,4	-7,1	-15,4	-4,44
	b / 10 ⁻²	1,88	8,01	18,1	3,84	11,44
R		0,9998	0,9990	0,9998	0,9985	0,9999
LD / mg kg ⁻¹		0,32	1,36	0,098	0,81	0,087
LQ/ mg kg ⁻¹		0,97	4,12	0,30	2,47	0,264

a= coeficiente linear, b = coeficiente angular, C = concentração em mg L⁻¹; R = coeficiente de correlação; LD= limite de detecção; LQ= limite de quantificação.

4.4.1.3. Precisão

Neste trabalho, a precisão foi avaliada por meio da repetibilidade e seus valores expressos em termos do desvio padrão relativo. Avaliou-se a repetibilidade de dois parâmetros cromatográficos, o tempo de retenção e a área do sinal analítico. Uma solução padrão contendo os íons acetato (4,0 mg L⁻¹), formiato (8,0 mg L⁻¹), cloreto (1,2 mg L⁻¹), fosfato (4,0 mg L⁻¹) e sulfato (2,0 mg L⁻¹) foi analisada cinco vezes consecutivamente no cromatógrafo de íons. Os valores médios obtidos para o tempo de retenção e a área do sinal analítico, assim como também os desvios padrão relativos são mostrados na Tabela 4.6. Todas as amostras de biodiesel foram analisadas em triplicata e a precisão expressa em termos do desvio padrão relativo.

Tabela 4.6. *Repetibilidade do tempo de retenção e área do sinal analítico para os íons acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato.*

Analito	Tempo de retenção / (min)	DPR / (%)	Área do sinal ($\mu\text{S cm}^{-1}$) min	DPR / (%)
Acetato	6,21	0,07	0,081	0,55
Formiato	6,83	0,0	0,634	0,24
Cloreto	8,83	0,05	0,257	0,78
Fosfato	22,82	0,04	0,123	0,81
Sulfato	26,46	0,04	0,267	0,17

Os resultados dos ensaios da repetibilidade do procedimento cromatográfico indicam uma boa precisão para o método proposto, com desvios padrão relativos abaixo de 1 %.

4.4.1.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação. Vários sais foram testados para serem utilizados como padrão dos analitos, como por exemplo, cloreto de sódio, cloridrato de cisteína, cloridrato de vancomicina, cloridrato de hidroxilamina, acetato de sódio, formiato de sódio, sulfato de sódio. No entanto, nenhum destes sais apresentou-se solúvel no biodiesel, o que impossibilitou o emprego destes como padrão nos testes de adição e recuperação. Sendo assim, decidiu-se empregar soluções etanólicas preparadas a partir dos ácidos acético, fórmico, fosfórico e sulfúrico e também de 2-cloro-2-metil-propano para fortificação das amostras.

As amostras foram fortificadas com os analitos separadamente em três diferentes concentrações. Os cálculos da recuperação foram realizados de acordo com a Equação 4.9 (INMETRO, 2010).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (4.9)$$

Sendo que:

C_1 representa a concentração determinada na amostra adicionada;

C_2 representa a concentração determinada na amostra não-adicionada;

C_3 representa a concentração adicionada.

A Figura 4.46 ilustra alguns cromatogramas obtidos para os testes de recuperação dos íons acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato em uma amostra de biodiesel de soja.

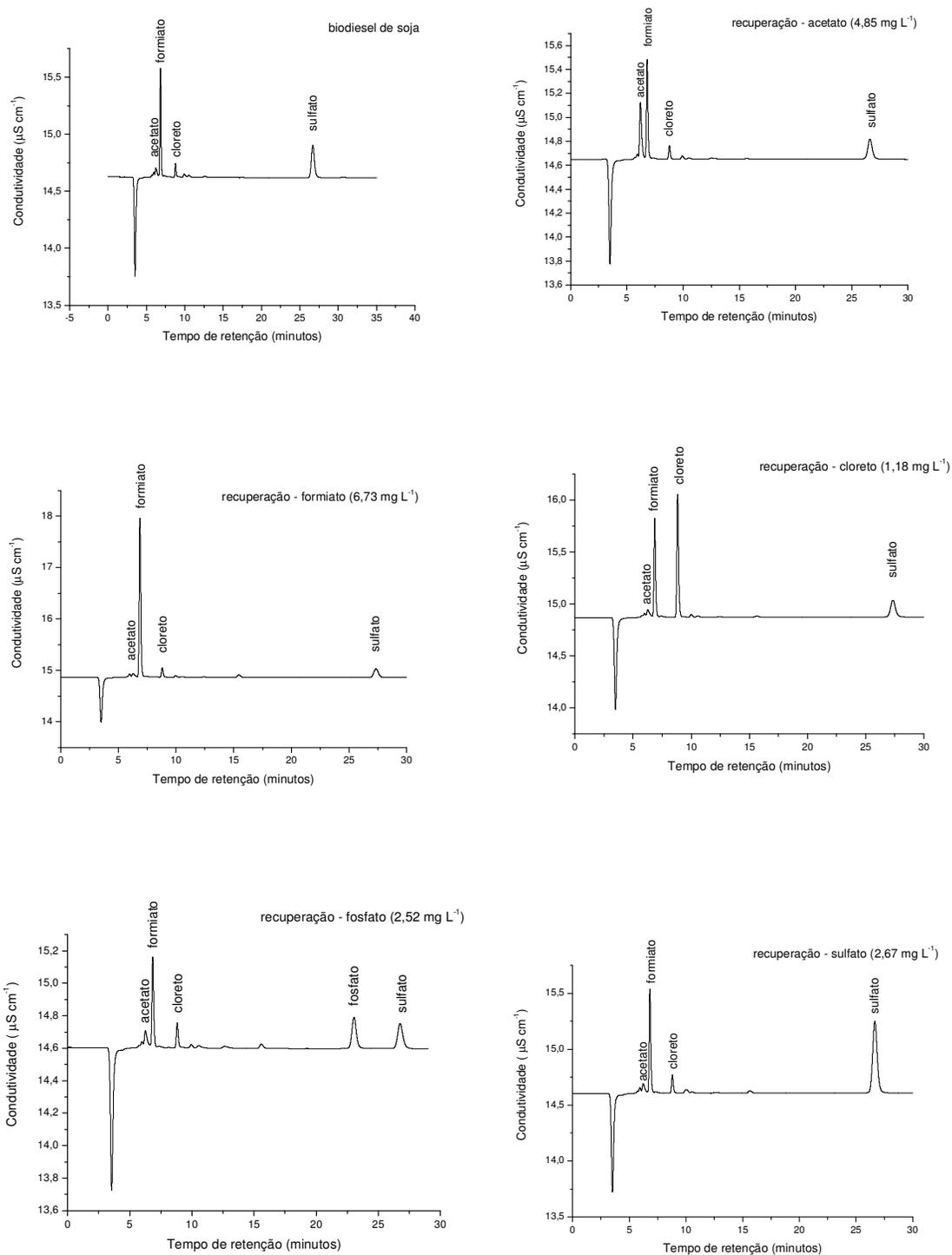


Figura 4.46. Cromatogramas relativo à recuperação dos íons acetato, formiato, cloreto, sulfato e fosfato em biodiesel de soja.

Gonzalez *et al.* (1999) sugerem que a média da recuperação pode ser avaliada através do teste de significância *t*. Sendo assim, para os resultados dos testes de recuperação, aplicou-se teste-*t* a um nível de 95 % de confiança e considerou-se 100 % de recuperação como o valor ideal ou valor verdadeiro.

Para os testes de recuperação, realizados em três níveis de concentração, em triplicata ($n=3$), os resultados são mostrados na Tabela 4.7, assim como os valores de *t* calculado (t_{cal}) obtidos para comparação através do programa *Origin* 6.0. O valor de *t* crítico (t_{crit}) para $n=3$ em um nível de confiança de 95 % é 4,30. Como $t_{cal} < t_{crit}$ para todos os testes de recuperação realizados pode se dizer que o método apresenta uma boa exatidão.

Tabela 4.7. Recuperação dos ânions acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato em biodiesel de soja por cromatografia de íons.

Ânion	Concentração / mg kg ⁻¹			Recuperação / %	DP	DPR (%)	t_{cal}
	Inicial	Adicionada	Encontrada				
Acetato	2,33 ± 0,11	2,0810	4,64	111,0	10,1	9,1	1,9
		6,2401	8,87	104,8	2,59	2,5	3,2
		10,3844	12,87	101,5	1,54	1,5	1,7
Formiato	4,87 ± 0,48	7,9105	12,89	101,4	2,55	2,5	0,95
		17,7902	24,20	108,6	6,30	5,8	2,4
		26,2644	29,28	92,9	9,55	10,3	1,3
Cloreto	0,952 ± 0,11	1,1221	2,24	114,8	14,7	12,8	1,7
		2,2484	3,32	105,3	3,74	3,6	2,4
		3,3709	4,15	94,9	2,88	3,0	3,1
Fosfato	ND	10,3826	8,91	85,8	5,79	6,7	4,2
		7,9489	6,96	87,6	7,53	8,6	2,9
		5,2972	4,72	89,1	5,37	6,0	3,5
Sulfato	0,757 ± 0,14	2,4214	2,83	85,6	6,29	7,3	4,0
		3,4017	3,77	88,6	7,90	8,9	2,5
		5,6713	5,58	85,0	6,20	7,3	4,2

ND= Não detectado

Os valores de recuperação obtidos variaram de 85,0 a 114,8 %. De modo geral, os resultados expressam uma boa recuperação dos analitos, indicando uma boa exatidão. Dessa forma, os resultados da recuperação mostram que o processo de extração empregado é eficiente para a determinação dos íons acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato em biodiesel. Além do biodiesel de soja o método foi aplicado para outras amostras de biodiesel.

4.4.2. Análise de amostras de biodiesel

Amostras de biodiesel obtido de óleos de canola, sebo bovino, soja bruto e girassol foram analisadas por cromatografia de íons. A Figura 4.47 apresenta os cromatogramas obtidos para estas amostras.

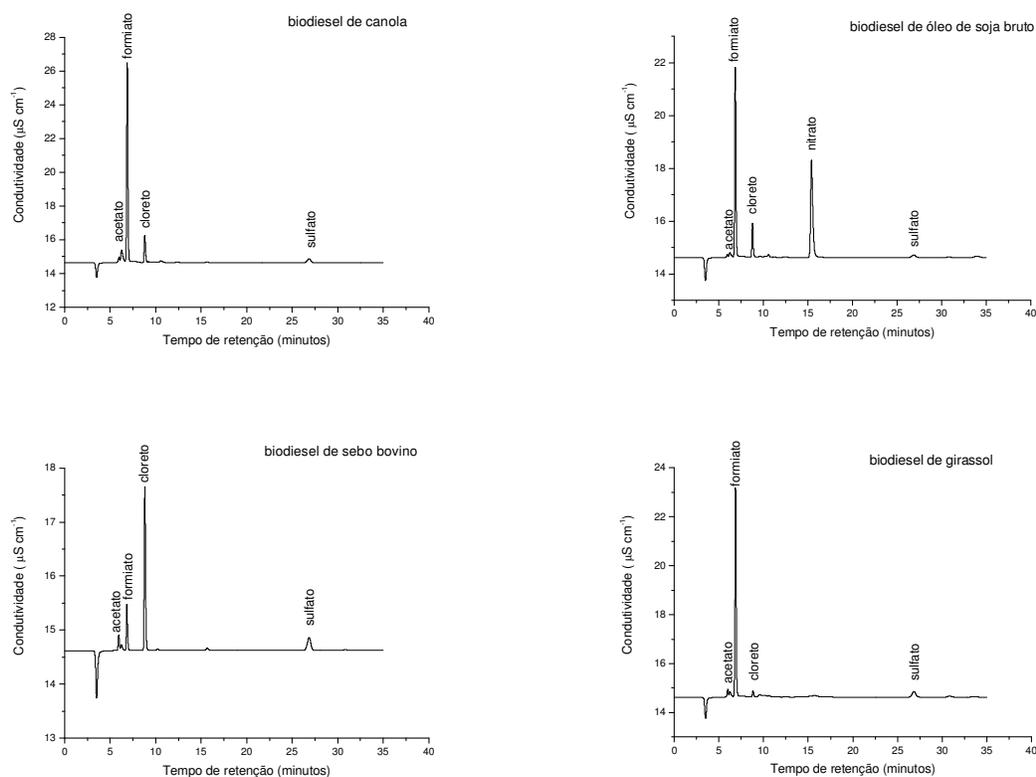


Figura 4.47. Cromatogramas obtidos para os extratos das amostras de biodiesel analisadas por cromatografia de íons.

Para todas as amostras analisadas observou-se a presença dos íons acetato, formiato, cloreto e sulfato. Para a amostra de biodiesel de soja bruto, além destes íons foi observado também a presença do íon nitrato. O íon fosfato não foi identificado em nenhuma das amostras analisadas.

Os resultados obtidos da análise das amostras de biodiesel por cromatografia de íons realizadas em triplicata estão mostrados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Concentração (mg kg^{-1}) dos ânions acetato, formiato, cloreto e sulfato em biodiesel analisados por cromatografia de íons ($n=3$).

Biodiesel	Acetato $/\text{mg kg}^{-1}$	DPR (%)	Formiato $/\text{mg kg}^{-1}$	DPR (%)	Cloreto $/\text{mg kg}^{-1}$	DPR (%)	Sulfato $/\text{mg kg}^{-1}$	DPR (%)
Soja bruto	5,90	10,7	34,7	12,4	3,03	3,3	1,10	6,8
Canola	21,7	7,8	54,9	1,1	3,94	7,2	2,63	8,4
Sebo bovino	3,03	7,5	3,22	11,5	4,46	6,7	1,65	4,8
Girassol	5,81	3,5	42,4	5,7	0,64	9,4	6,50	5,9

De acordo com os resultados das análises de biodiesel, mostrados na Tabela 4.8 percebe-se que entre os ânions orgânicos, o íon formiato apresenta-se em maior concentração para todas as amostras. A amostra de biodiesel de canola obtido por rota etílica foi a única amostra a apresentar alta concentração do íon acetato.

Todas as amostras apresentaram baixos teores dos íons inorgânicos cloreto e sulfato. A concentração de enxofre total, segundo a ANP não deve estar acima de $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$. Para as amostras analisadas, se o teor de sulfato for considerado representante do enxofre total, está dentro do limite estabelecido. O teor de cloreto ainda não é regulamentado para biodiesel. Em relação ao fósforo, o mesmo não foi detectado em nenhuma das amostras de biodiesel.

Embora os íons acetato e formiato não tenham os seus limites regulamentados para biodiesel percebe-se que é de grande importância o estudo a cerca da sua presença neste biocombustível, pois podem fornecer informações relevantes sobre o seu grau de oxidação.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

O procedimento de preparo de amostras empregando extração líquido-líquido com água, assistida por ultrassom, mostrou-se eficiente na extração dos ânions acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato em biodiesel. Tal procedimento apresenta vantagens ambientais, pois não há a necessidade do uso de solventes orgânicos, assim como também econômicas, pois no processo de extração emprega-se apenas água desionizada. A técnica de cromatografia de íons mostrou-se viável para a separação e quantificação de ânions orgânicos e inorgânicos em biodiesel, simultaneamente, diminuindo assim, o tempo de análise. Tais vantagens caracterizam o método proposto como sendo limpo e amigo do meio ambiente.

Os limites de quantificação obtidos para o método proposto empregando a técnica de cromatografia de íons foram 0,97; 4,10; 0,30; 2,47 e 0,26 mg kg⁻¹ para acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato, respectivamente. Os valores de limites de quantificação são suficientemente baixos para a determinação dos referidos íons em amostras de biodiesel.

As análises realizadas por ESI-MS permitiram confirmar a presença do ácido glicerofosfórico, após o procedimento de oxidação por radiação ultravioleta, nas amostras de biodiesel fortificadas com fósforo na forma de lecitina de soja.

Os testes da oxidação empregando a radiação ultravioleta não apresentaram eficiência para a formação dos íons fosfato em biodiesel, no entanto, levaram à altas concentrações dos íons acetato e formiato despertando o interesse para investigação da origem destes ânions no biodiesel.

A análise da estabilidade oxidativa das amostras de biodiesel pelo método Rancimat confirmaram que os teores dos íons acetato e formiato nas amostras de biodiesel analisadas eram provenientes da auto-oxidação desse biocombustível.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos desenvolvidos nesta tese de doutorado contribuem de forma significativa para a melhoria do controle de qualidade do biodiesel.

Os estudos da relação entre ponto de fulgor e o teor de álcool residual mostrados no capítulo 2 mostraram que há uma relação direta entre estes dois parâmetros. A determinação do teor de álcool em biodiesel atualmente é realizada por cromatografia a gás, um procedimento muito mais caro do que as medidas de ponto de fulgor. Dessa forma, pode-se sugerir o uso das medidas de ponto de fulgor para a determinação do teor de álcool residual em biodiesel. Além disso, os estudos indicaram que poderia ser estabelecido limite de ponto de fulgor de 39 °C, aproximadamente, o que corresponderia a 0,7 % m/m do teor de álcool residual. Tal limite simplificaria a produção do biodiesel, diminuindo os custos com as etapas para remoção do álcool residual.

No capítulo 3 foi apresentado o método espectrofotométrico para a determinação de fósforo. Trata-se de uma alternativa aos métodos regulamentados pelas agências, com algumas vantagens em relação a estes: não emprega solventes orgânicos; é de custo muito mais baixo; é simples de ser realizado; o espectrofotômetro é um equipamento comumente encontrado na maioria dos laboratórios analíticos.

O método proposto para a determinação dos íons acetato, formiato, cloreto, fosfato e sulfato por cromatografia de íons apresentados no capítulo 4 mostra-se uma excelente estratégia para análise de biodiesel. O método consiste da extração dos íons por extração líquido-líquido assistida por ultrassom, onde apenas água é empregada no procedimento. A técnica de cromatografia de íons mostrou-se eficiente na separação e quantificação simultânea dos íons orgânicos acetato e formiato e também dos íons cloreto, fosfato e sulfato em biodiesel diminuindo o tempo de análise.

O método envolvendo digestão por radiação ultravioleta e análise por cromatografia de íons, apresentou-se eficiente para a avaliação do teor de fósforo

em lecitina de soja. Dessa forma, constitui-se como método alternativo que pode contribuir para o controle de qualidade da lecitina de soja comercial.

Os estudos da oxidação do biodiesel por radiação ultravioleta não foram satisfatórios para a formação dos íons fosfato em amostras de biodiesel, no entanto, os resultados obtidos das altas concentrações de acetato e formiato após a irradiação com UV possibilitaram a investigação da origem desses ânions orgânicos no biodiesel.

As análises das amostras por ESI-MS permitiram confirmar a presença do ácido glicerofosfórico nas amostras de biodiesel, fortificadas com lecitina de soja, após a irradiação ultravioleta.

A avaliação da estabilidade oxidativa das amostras de biodiesel confirmaram que há uma ligação entre a presença dos íons acetato e formiato no biodiesel com a estabilidade oxidativa do mesmo.

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho apontam para a necessidade urgente de uma revisão das normas que regulamentam alguns parâmetros do biodiesel, principalmente, no que diz respeito ao teor de álcool e ao ponto de fulgor. Também, a norma que estabelece a determinação de fósforo pela técnica ICP OES deve ser, pelo menos, ampliada de modo a indicar, como alternativas, outros métodos como, por exemplo, os sugeridos nesta tese. Neste trabalho, sugerem-se dois métodos para a determinação de fósforo: um por espectrofotometria de absorção molecular e o outro por cromatografia de íons, neste caso é determinado especificamente o fosfato presente no biodiesel.

Os estudos iniciais realizados sobre a determinação dos íons orgânicos em biodiesel por cromatografia de íons abrem possibilidades para que novas pesquisas sejam desenvolvidas visando à determinação do grau de oxidação do biodiesel empregando como técnica a cromatografia de íons. Tais estudos podem ser feitos com base na determinação da concentração dos íons formiato, espécie majoritária, e também do íon acetato, que são formados durante o processo de oxidação do biodiesel.

Em face ao exposto, somos de opinião que deve ser feita, o mais brevemente possível, uma revisão das resoluções vigentes para o controle da qualidade do biodiesel. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa tem dedicado esforços no desenvolvimento de métodos analíticos que visam contribuir para a melhoria dos procedimentos de controle da qualidade deste biocombustível.

Os métodos desenvolvidos nesta pesquisa deverão ser submetidos à apreciação da ABNT de modo a poderem, se assim for julgado oportuno, vir a compor as normas referentes ao biodiesel.

REFERÊNCIAS

ABNT NBR 15553/2008. Produtos derivados de gorduras e óleos - ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos – Determinação dos teores de cálcio, magnésio, sódio, fósforo e potássio por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

ABNT/NBR 10894/2007. Álcool etílico - Determinação dos íons cloreto e sulfato – Método da Cromatografia de íons.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Resolução nº 07, 19 de março de 2008.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Resolução nº 65, 12 de dezembro de 2011.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Resolução nº 14, 18 de maio de 2012.

Application Note 203 Dionex. Determinação of cations in biodiesel using a reagent-free ion chromatography system with suppressed conductivity detection.

Araújo, A.R.T.S.; Saraiva, M.L.M.F.S.; Lima, J.L.F.C.; Korn, M.G.A. Flow methodology for methanol determination in biodiesel exploiting membrane-based extraction. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 613, 177.

Aricetti, J.A.; Maciel, A.J. S.; Lopes, O.C.; Tubino, M. A simple green method for biodiesel iodine number determination. *Journal of ASTM International* **2009**, 7, 1.

Arzamendi, G.; Campo, I.; Arguinarena, E.; Sanchez, M. Montes, M.; Gandía, L.M. Synthesis of biodiesel from sunflower oil with silica-supported NaOH catalysts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2008**, 83, 862-870.

ASTM D4951/2009. Standard Test Method for Determination of Additive Elements in Lubricating Oils by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry.

ASTM D 93/2010. Standard Test Methods for Flash-Point by Pensky-Martens Closed Cup Tester.

Atabani, A.E.; Silitonga, A.S.; Badruddin, I.A.; Mahlia, T.M.I.; Masjuki, H.H.; Mekhilef, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2012**, 16, 2070.

Bezergianni, S.; Kalogera, K.; Pilavachi, P.A. On maximizing biodiesel mixing ratio based on final product specifications. *Computers and Chemical Engineering* **2011**, 35, 936.

Bogenschütz, G.; Kolb, Ion chromatographic determinations of anions, cations and organic acids in biofuels. Application Note Metrohm 80006011EN.

Boog, J.H.F.; Silveira, E.L.C.; Caland, L.B.; Tubino, M. Determining the residual alcohol in biodiesel through its flash point. *Fuel* **2011**, 90, 905.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Decreto nº 2314 de 4 de set de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 171, 5 de set de 1997. Seção I, p.19556. [Regulamenta a Lei no. 8918, de 14-07-1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e fiscalização de bebidas].

Buldini, P.L.; Sharma, J.L.; Determination of total phosphorus in soaps/detergents by ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **1993**, 654, 129.

Buldini, P.L.; Ferri, D.; Sharma, J.L. Determination of some inorganic species in edible vegetable oils and fats by ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **1997**, 789, 549.

Buldini, P. L.; Cavalli, S.; Sharma, J.L. Determination of Transition Metals in Wine by IC, DPASV-DPCSV, and ZGFAAS Coupled with UV Photolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, 1993.

Buldini, P.L.; Cavalli, S.; Mevoli, A.; Sharma, J.L. Ion Chromatography and voltametric determination of heavy and transition metals in honey. *Food Chemistry* **2001**, 73, 487.

Buldini, P.L.; Cavalli, S.; Sharma, J.L. Matrix removal for the ion chromatographic determination of some trace elements in milk. *Microchemical Journal* **2002**, 72, 277.

Caland, L.B.; Silveira, E.L.C.; Tubino, M. Determination of sodium, potassium, calcium and magnesium cations in biodiesel by ion chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 718, 116.

Campos, R.C.; Correia, C.L.T.; Vieira, F.; Saint’Pierre, T.D.; Oliveira, A.C.; Gonçalves, R. Direct determination of P in biodiesel by high resolution continuous source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* **2011**, 66, 352.

Cavicchioli, A.; Gutz, G.R. O uso da radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica. *Química Nova* **2003**, 26, 913.

Cernoch, M.; Hájec, M.; Skopal, F. Relationships among flash point, carbon residue, viscosity and some impurities in biodiesel after ethanolysis of rapeseed oil. *Bioresource Technology* **2010**, 101, 7397.

Chaves, E.S.; Loos-Vollebregt, T.C.; Curtius, A.J.; Vanhaecke, F. Determination of trace elements in biodiesel and vegetable oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry following alcohol dilution. *Spectrochimica Acta Part B* **2011**, 66, 733.

Coks, L.V.; Van Rede, C. Laboratory Handbook for Oils and Fats Analysis. London: Academic Press; **1966**, p. 196.

Collins, C.H.; Braga, G.; Bonato, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora Unicamp; **2006**, p.106.

Colina, M.; Gardiner, P.H.E. Simultaneous determination of total nitrogen, phosphorus and sulphur by means of microwave digestion and ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **1999**, 847, 285.

Corbridge, D.E.C. *Phosphorus: An outline of its Chemistry, Biochemistry and Technology*. Elsevier. 4ed. **1990**.

Costa Neto, P.R.; Caro, M.S.B.; Mazzuco, L.M.; Nascimento, M.G. Quantification of soybean oil ethanolysis with ^1H NMR. *Journal of the American Oil Chemists Society* **2004**, 81, 1111.

Dabdoub, M.J.; Bronzel, J.I. Rampin, M.A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. *Quimica Nova* **2009**, 32, 776.

DeMan, J.M.; deMan, L. Formation of short chain volatile organic acids in the automated AOM method. *Journal of the American Oil Chemists Society* **1987**, 64, 993.

Demirbas, A. Fuel properties of seventeen vegetable oils. *Energy Sources* **2003**, 25, 721.

Demirbas, A. Relationships derived from physical properties of vegetable oil and biodiesel fuels, *Fuel* **2008**, 87, 1743.

Dorado, M. P.; Pinzi, S.; Haro, A.; Font, R.; Garcia-Olmo, J. Visible and NIR Spectroscopy to assess biodiesel quality: Determination of alcohol and glycerol traces. *Fuel* **2011**, 90, 2321.

Dugo, G.; Pellicano, T.M.; Pera, L.; Turco, V.L.; Tamborrino, A.; Clodoveo, M.L. Determination of inorganic anions in commercial seed oils and in virgin olive oils produced from de-stoned olives and traditional extraction methods, using suppressed ion exchange chromatography (IEC). *Food Chemistry* **2007**, 102, 599.

Edlund, M.; Visser, H.; Heitland, P. Analysis of biodiesel by argon-oxygen mixed-gas inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, 17, 232.

Eith, C.; Kolb, M.; Rumi, A.; Seubert, A.; Viehweger, K.H. Práticas em cromatografia de íons: uma introdução. Monografia Metrohm, **2006**.

Emmenegger, C.; Wille, A.; Steinbach, A. Sulfur and halide determination by combustion ion chromatography. *The application notebook (Metrohm)* **2010**.

EN 14110/2001. Fat and oil derivates – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of methanol content.

EN 14112/2003. Fat and oil derivates – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test).

Felizardo, P.; Baptista, P.; Uva, M.S.; Menezes, J.C.; Correia, M.J.N. Monitoring biodiesel fuel quality by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **2007**, 15, 97.

Felizardo, P.; Baptista, P.; Menezes, J.C.; Correia, M.J.N. Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting methanol and water content in biodiesel. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 595, 107.

Fernando, S.; Karra, P.; Hernandez, R.; Jha, S.K. Effect of incompletely converted soybean oil on biodiesel quality. *Energy* **2007**, 32, 844.

Ferrão, M.F.; Viera, M.S.; Pazos, R.E.P.; Fachine, D.; Gerbase, A.E.; Marder, L. Simultaneous determination of quality parameters of biodiesel/diesel blends using HATR-FTIR spectra and PLS, iPLS or siPLS regressions. *Fuel* **2011**, 90, 701.

Ferreira, H.B.P.; Lima, T.A.F.; Barbeira, P.J.S. Voltammetric determination of chloride íon in automotive fuel ethanol. *Electroanalysis* **2008**, 390-395.

Gelbard, G.; Bres, O.; Vargas R. M.; Vielfaure F.; Schuchardt U. ¹H nuclear magnetic resonance determination of the yield of the transesterification of rapeseed oil with methanol. *Journal of the American Oil Chemists Society* **1995**, 72, 1239.

Golimowski, J.; Golimowska, K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. *Analytica Chimica Acta* **1996**, 325, 111.

González, A.G.; Herrador, M.A.; Asuero, A.G. Intra-laboratory by testing of method accuracy from recovery assays. *Talanta* **1999**, 48, 729.

Gungstone, F.D.; Harwood, J.L.; Dijkstra, A.J. *The lipid handbook*. CRC Press Taylor & Francis Group. **2007**, p. 538.

Guo, Y.; Yang, F.; Xing, Y.; Li, D.; Fang, W.; Lin, R. Study on volatility and flash point of the pseudo binary mixtures of sunflower-based biodiesel + methylcyclohexane. *Fluid Phase Equilibria* **2008**, 276, 127.

Guo, Y.; Wei, H.; Yang, F.; Li, D.; Fang, W.; Lin, R. Study on volatility and flash point of the pseudo-binary mixtures of sunflowerseed-based biodiesel + ethanol. *J Hazardous Materials* **2009**, 167, 625.

Haddad, P. R; Jackson, P.E. Ion chromatography: principles and applications. *Journal of Chromatography Library*, v. 46, **1995**.

Herberth, C.G.; Johnstone, K.A.W. *Mass Spectrometry Basics*. CRC Press. **2003**.

Higuch, K.; Tamanouchi, H.; Motomizu, S. On-line photo-oxidative decomposition of phosphorus compounds to orthophosphate and its application to flow injection spectrophotometric determinations of total phosphorus in river and waste waters. *Analytical Sciences* **1998**, 14, 941.

Hoekman, S.K.; Broch, A.; Robbins, C.; Cenicerros, E.; Natarajan, M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2012**, 16, 143.

Hoffman, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principle and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd. 3^a ed. **2007**.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008; **2003**.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008; **2010**.

Jackson, P.E. Determination of inorganic ions in drinkingwater by ion chromatography. *Trens in Analytical Chemistry* **2001**, 20, 320, 2001.

Jastrzebska, A. Modifications of spectrophotometric methods for total phosphorus determination in meat samples. *Chemical Papers* **2009**, 63,47.

Kamal-Eldin, A.; Pokorný, J. Analysis of lipid oxidation. AOCS Press. **2005**, 1.

Kharat, S.J.; Pagar, S.D. Determination of phosphate in water samples of Nashik District (Maharashtra State, India) rivers by UV-visible spectroscopy. *E-J Chem* **2009**, 6, 515.

Khoury, R.R.; Ebrahimi, D.; Hejazi, L.; Bucknall, M.P.; Pickford, R.; Hibbert, D.B. Degradation of fatty acid methyl esters in biodiesels exposed to sunlight and seawater. *Fuel* **2011**, 2677.

Knothe, G. Monitoring a Progressing Transesterification Reaction by Fiber-Optic Color Near Infrared Spectroscopy with Correlation to ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists Society* **2000**, 77, 489.

Knothe, G. Structure Indices in FA Chemistry. How Relevant Is the Iodine Value? *Journal of the American Oil Chemists Society* **2002**, 79, 847.

Knothe, G. Analyzing Biodiesel: Standards and Other Methods. *Journal of the American Oil Chemists Society* **2006**, 10, 83.

Knothe, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. *Fuel Processing Technology* **2007**, 88, 669.

Knothe, G. A technical evaluation of biodiesel from vegetable oils vs. algae. Will algae-derived biodiesel perform? *Green Chemistry* **2011**, 13, 3048.

Knothe, G.; Krahl, J.; Gerpen, J.V.; Ramos, L.P. Manual de biodiesel. São Paulo: Editora Edgar Blücher; **2006**.

Korn, M.G.A.; Santos, D.S.S.; Welz, B.; Vale, M.G.R.; Teixeira, A.P.; Lima, D.C.; Ferreira, S.L.C. Review Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels—A review. *Talanta* **2007**, 73, 1.

Korn, M.G.; Santos, D.C.M.B.; Guida, M.A.B.; Barbosa, I.S.; Passos, M.L.C.; Saraiva, M.L.M.F.S.; Lima, J.L.F.C. Evaluation of digestion procedures for simultaneous determination of Ca, P, Mg, K and Na in biodiesel by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2010**, 21, 2278.

Krug, F.J. *Método de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*. Piracicaba. **2010**.

Kunz, A.; Peralta-Zamora, P.; Moraes, S.G.; Durán, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova* **2002**, 25, 78.

Lapuerta, M.; Fernandez, J.R.; Mora, E.F. Correlation for the estimation of the cetane number of biodiesel fuels and implications on the iodine number. *Energy Policy* **2009**, 37, 4337.

Lepri, F.G.; Chaves, E.S.; Vieira, M.A.; Ribeiro, A.S.; Curtius, A.J.; Oliveira, L.C.C.; Campos, R.C. Determination of trace elements in vegetable oils and

biodiesel by atomic spectrometric techniques – A review. *Applied Spectroscopy Reviews* **2011**, 46, 175.

Lopez-Moreno, C.; Viera, I.; Urbano, A.M. Validation of an ion chromatographic method for the quantification of anions in water. *Desalination* **2010**, 261, 111.

López-Ruiz, B. Advances in the determination of inorganic anions by ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **2000**, 881, 607.

Lyddy-Meaney, A.; Ellis, P.S.; Worsfold, P.J.; Butler, C.V.; McKelvie, I.D. A compact flow injection analysis system for surface mapping of phosphate in marine waters. *Talanta* **2002**, 58, 1043.

Lira, L.F.B.; Santos, D.C.M.B.; Guida, M.A.B.; Stravegitch, L.; Korn, M.G.A.; Pimentel, M.F.; Paim, A.P.S. Determination of phosphorus in biodiesel using FIA with spectrophotometric detection. *Fuel* **2011**, 90, 3254.

Lôbo, I.P.; Ferreira, S.L.C.; Cruz, R.S. Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova* **2009**, 32, 1596.

Lobo, F.A.; Goveia, D.; Oliveira, A.P.; Romão, L.P.C.; Fraceto, L.F.; Dias Filho, N.L.; Rosa, A.H. Development of a method to determine Ni and Cd in biodiesel by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Fuel* **2011**, 90, 142.

Loury, M.; Possible mechanisms of autoxidative rancidity. *Lipids* **1972**, 7, 671.

Lucy, C.A. Evolution of ion-exchange: from Moses to the Manhattan Project to Modern Times. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1000, 711.

Lyra, F.H.; Carneiro, M.T.W.D.; Brandão, G.P.; Pessoa, H.M.; Castro, E.V.R. Direct determination of phosphorus in biodiesel samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a solid sampling accessory. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2009**, 24, 1262.

Ma, F.; Hanna, M.A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology* **1999**, 70, 1.

Manjusha, R.; Dash, K.; Karunasagar, D. UV-photolysis assisted digestion of food samples for the determination of selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). *Food Chemistry* **2007**, 105, 260.

Mendow, G.; Monella, F.C.; Pisarello, M.L.; Querini, C.A. Biodiesel production from non-degummed vegetable oils: Phosphorus balance throughout the process. *Fuel Processing Technology* **2011**, 92, 864.

Mertins O.; Sebben, M.; Schneider, P.H.; Pohlmann, A.R.; Silveira, N.P. Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de ^1H e de ^{31}P . *Química Nova* **2009**, 31, 1856.

Michalski, R. Ion chromatography as a reference method for determination of inorganic ions in water and wastewater. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2006**, 36, 107.

Monteiro, M.R.; Ambrozin, A.R.P.; Lião, L.M.; Ferreira, A.G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta* **2008**, 77, 593.

Monyem, A.; Gerpen, J.H.V. The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. *Biomass and Bioenergy* **2001**, 20, 317.

Motomizu, S.; Li, Z.H. Trace and ultratrace analysis methods for the determination of phosphorus Br flow-injection techniques. *Talanta* **2005**, 66, 332.

Murugesan, A.; Umarani, C.; Chinnusamy, T.R.; Krishnan, M.; Subramanian, R.; Neduzchezain. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2009**, 13, 825.

Nerín, C.; Salafranca, J.; Aznar, M.; Batlle, R. C. Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 393, 809.

Nogueira, T. Eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato aplicada à avaliação da qualidade de biocombustíveis (biodiesel e etanol) e ao estudo sobre os processos de oxidação do biodiesel. Tese de doutorado. USP São Paulo, **2011**.

Nogueira, T.; Lago, C.L. Determination of Ca, K, Mg, Na, sulfate, phosphate, formate, acetate, propionate, and glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Microchemical Journal* **2011**, 99, 267.

Oliveira, A.P.; Villa, R.D.; Antunes, K.C.P.; Magalhães, A.; Silva, E.C. Determination of sodium in biodiesel by flame atomic emission spectrometry using dry decomposition for the sample preparation. *Fuel* **2009**, 88, 764.

Omonov, T.S.; Kharraz, E.; Curtis, J. M. Ozonolysis of canola oil. A study of product yields and ozonolysis kinetics in different solvent systems. *Journal of the American Oil Chemists Society* **2011**, 88, 689.

Paine, A.J.; Dayan, A.D. Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks. *Human & Experimental Toxicology* **2001**, 20, 563.

Parashivescu, M.C.; Alley, E.G.; French, W.T.; Hernandez, R.; Armbrust, K. Determination of methanol in biodiesel by headspace solid phase microextraction. *Bioresource Technology* **2008**, 99, 5901.

Park, Y.; Kim, Y.; Lee, D.W.; Lee, S.; Lee, K. Ion chromatographic determination method for the determination of inorganic anions in environmental samples of Korea. *Analytical Sciences* **2002**, 18, 343.

Pereira, J.S.F.; Diehl, L.O.; Duarte, F.A.; Santos, M.F.P.; Guimarães, R.C.L.; Dressler, V.L.; Flores, E.M.M. Chloride determination by ion chromatography in petroleum coke after digestion by microwave-induced combustion. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1213, 249.

Pinzi, S.; Leiva, D.; Arzamendi, G.; Gandia, L.M.; Dorado, M.P. Multiple response optimization of vegetable oils fatty acid composition to improve biodiesel physical properties. *Bioresor Technol* **2011**, 102, 7280.

Piovezan, M.; Costa, A.C.O.; Jager, A.V.; Oliveira, M.A.L.; Micke, G.A. Development of a fast capillary electrophoresis method to determine inorganic cations in biodiesel samples. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 673, 200.

Quadros, D.P.C.; Rau, M.; Idrees, M.; Chaves, E.S.; Curtius, A.J.; Borges, D.L.G. A simple and fast procedure for the determination of Al, Cu, Fe and Mn in biodiesel using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* **2011**, 66, 373.

Quintella, C.M.; Teixeira, L.S.G.; Korn, M.A.G.; Costa Neto, P.R.; Torres, E.A.; Castro, M.P.; Jesus, C.A.C. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. *Química Nova* **2009**, 32, 793.

Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* **2004**, 27, 771.

Ruiz-Calero, V.; Galceran, M.T. Ion chromatographic separations of phosphorus species: a review, *Talanta* **2005**, 66, 376.

Samios, D.; Pedreotti, F.; Nicolau, A.; Reiznautt, Q.B.; Martini, D.D.; Dalcin, F.M. A transesterification double step process – TDSP for biodiesel preparation from fatty acids triglycerides. *Fuel Processing Technology* **2009**, 90, 599.

Sandun, F.; Karra, P.; Hernandez, R.; Jha, S.K. Effect of incompletely converted soybean oil on biodiesel quality. *Energy* **2007**, 32, 844.

Sangita, D.; Kumar.; Narayan, G.; Hassarajani, S. Determination of anionic minerals in black and kombuchatea using ion chromatography, *Food Chemistry* **2008**, 111, 744.

Santos, E.J.; Herrmann, A.B.; Chaves, E.S.; Vechiatto, W.W.D.; Schoemberger, a.C.; Frescura, V.L.A.; Curtius, A.J. Simultaneous determination of Ca, P, Mg, K and Na in biodiesel by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry with internal standardization after multivariate optimization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2007**, 22, 1300.

Seubert, A.; Frenzel, W.; Schäfer, H.; Bogenschutz, G.; Schäfer, J. Sample preparation techniques for ion chromatography. Monography Metrohm. **2002**.

Sharma, Y.C.; Singh, B.; Upadhyay, S.N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel* **2008**, 87, 2355.

Shyla, B.; Mahadevaiah.; Nagendrappa, G. A simple spectrophotometric method for the determination of phosphate in soil, detergents, water, bone and food samples through the formation of phosphomolybdate complex followed by its reduction with thiourea. *Spectrochimica Acta Part A* **2011**, 78, 497.

Shepherd, J.E.; Perez, F.A. Kerosene lamps and cookstoves—The hazards of gasoline contamination. *Fire Safety Journal* **2008**, 43, 171.

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* **2010**, 14, 200.

Silva, F.A.M.; Borges, M.F.M.; Ferreira, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova* **1999**, 94.

Silva, J.S.A.; Chaves, E.S.; Santos, E.J.; Saint’Pierre, T.D.; Frescura, V.L.A.; Curtius, A.J. Calibration Techniques and Modifiers for the Determination of Cd, Pb and Tl in Biodiesel as Microemulsion by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2010**, 21, 620.

Silveira, E.L.C.; Caland, L.B.; Tubino, M. Molecular absorption spectrophotometric method for the determination of phosphorus in biodiesel. *Fuel* **2011**, 90, 3485.

Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 8^a ed. **2006**.

Small, H.; Stevens, T. S.; Bauman, W.C. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. *Analytical Chemistry* **1975**, 47, 1801.

Souza, R.M.; Leocádio, L.G.; Silveira, C.L. ICP OES Simultaneous determination of Ca, cu, Fe, Mg, Mn, Na, and P in biodiesel by axial and radial inductively coupled plasma – optical emission spectrometry. *Analytical Letters* **2008**, 41, 1615.

Su, Y.; Liu, Y.A. Selection of Prediction Methods for Thermophysical Properties for

Process Modeling and Product Design of Biodiesel Manufacturing. *Industrial Chemical Engineering Research* **2011**, 50, 6809.

Suarez, P.A.Z.; Santos, A.L.F.; Rodrigues, J.P.; Alves, M.B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova* **2009**, 32, 768.

Szydlowska-Czerniak, A.; Szlyk E. Spectrophotometric determination of total phosphorus in rape seeds and oils at various stages of technological process: calculation of phospholipids and non-hydratable phospholipids contents in rapeseed oil. *Food Chemistry* **2003**, 81, 613.

Szydlowska-Czerniak, A. MIR spectroscopy and partial least-squares regression for determination of phospholipids in rapeseed oils at various stages of technological process. *Food Chemistry* **2007**, 105, 1179.

Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA-UNICAMP.- T113, versão II. 2. ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, **2006**, 113 p.

The Merck Index, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA, published by Chapman & Hall EPD, 1997 CD-ROM version 12:2.

Torres-Jimenez, E.; Svoljsak-Jerman, M.; Gregorc, A.; Lisec, I.; Dorados, M.P.; Kegl, B. Physical and Chemical Properties of Ethanol-Biodiesel Blends for Diesel Engines. *Energy Fuels* **2010**, 24, 2002.

Torrezani, I.; Saczk, A.A.; Oliveira, M.F.; Stradiotto, N.R.; Okumura, L.L. Voltammetric Determination of Phosphate in Brazilian Biodiesel Using Two Different Electrodes. *Electroanalysis* **2011**, 23, 2456.

Tubino, M.; Torres, J.R.O. Determination of calcium, phosphorus and potassium in leaf tissues by extraction with ethanol-water solvent. *Analytical Letters* **1990**, 12, 2339.

Tubino, M.; Aricetti, J. A. A Green Method for Determination of acid number of biodiesel. *Journal of Brazilian Chemistry Society* **2011**, 22, 1073.

Vieira, M.A.; Oliveira, L.C.C.; Gonçalves, R.A.; Souza, V.; Campos, R.C. Determination of As in vegetable oil and biodiesel by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Energy Fuels* **2009**, 23, 5942.

Weiss, J. *Ion chromatography*. New York: VCH Publishers. 2 nd, **1995**, p. 67.

Woods, G.D.; Fryer, F.I. Direct elemental analysis of biodiesel by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 389, 753.

Worsfold, P.J.; Gimbert, L.J.; Mankasingh, U.; Omaka, O.N.; Hanrahan, G.; Gardolinski, P.C.F.C.; Haygarth, P.M.; Turner, B.L.; Keith-roach, M.J.; McKelvie, I.D. Sampling, sample treatment and quality assurance issues for the determination of phosphorus species in natural waters and soils. *Talanta* **2005**, 66, 273.

Yuan, H.; Yang, B. Yang, J. Relationships among flash point, carbon residue, viscosity and some impurities in biodiesel after ethanolysis of rapeseed oil. *Journal of American Oil Chemistry Society* **2009**, 86, 375.

Yunus, S.M.; Hamim, H.M.; Anas, O.M.; Aripin, S.N.; Arif, S.M. Mo (VI) reduction to molybdenum blue by *Serratia marcescens* Strain Dr. Y9. *Polish Journal of Microbiology* **2009**, 58, 141.

Zeza, T.C.; Castilho, M.S.; Stradiotto, N.R. Determination of phosphorus in biodiesel using 1:12 phosphomolybdic modified electrode by cyclic voltammetry. *Fuel* **2012**, 95, 15.

ANEXOS

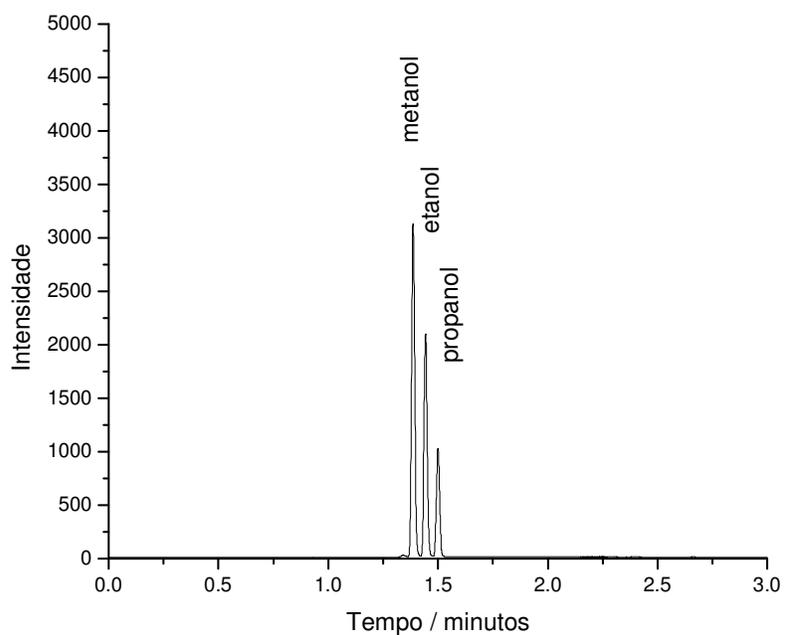


Figura A1. Cromatograma por GC-FID para padrão de metanol e etanol (0,5 % m/m) em biodiesel . Adição de propanol como padrão interno.

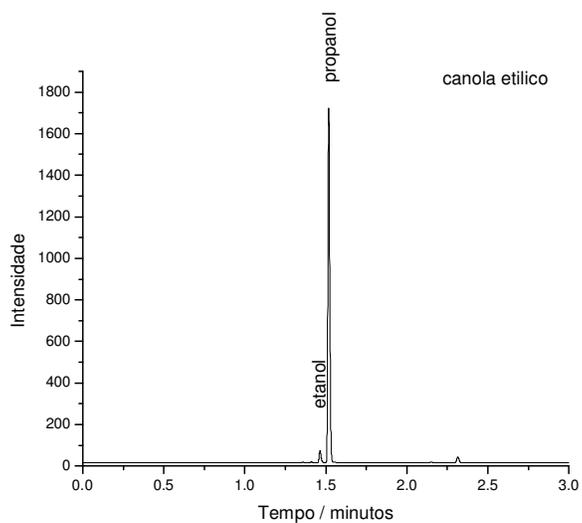


Figura A2. Cromatograma obtido por GC-FID para biodiesel de canola etílico.

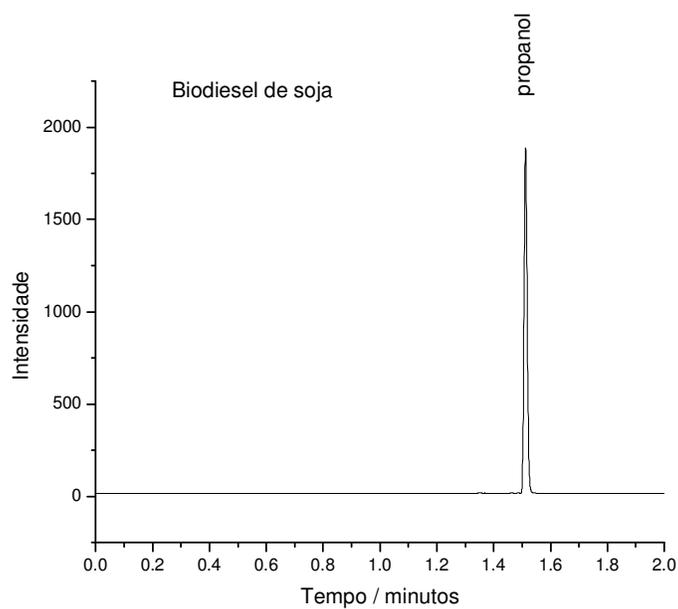


Figura A3. Cromatograma obtido por GC-FID para biodiesel de soja.

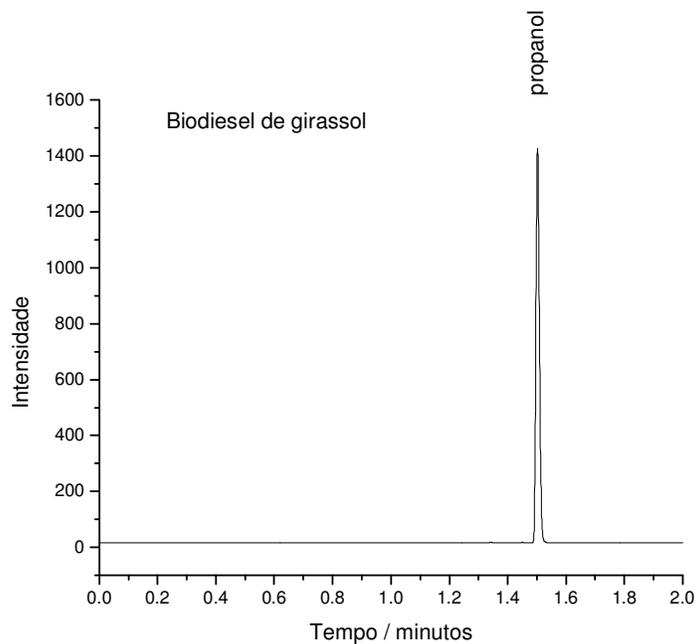


Figura A4. Cromatograma obtido por GC-FID para biodiesel de girassol.

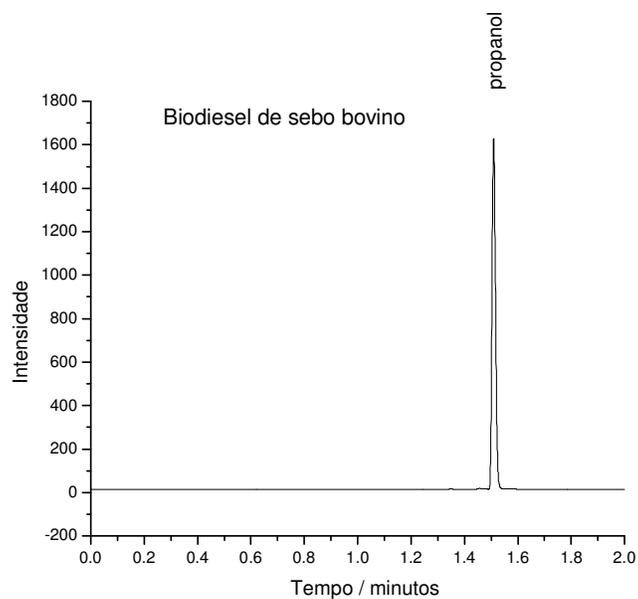


Figura A5. Cromatograma obtido *por GC-FID* para biodiesel de sebo bovino.

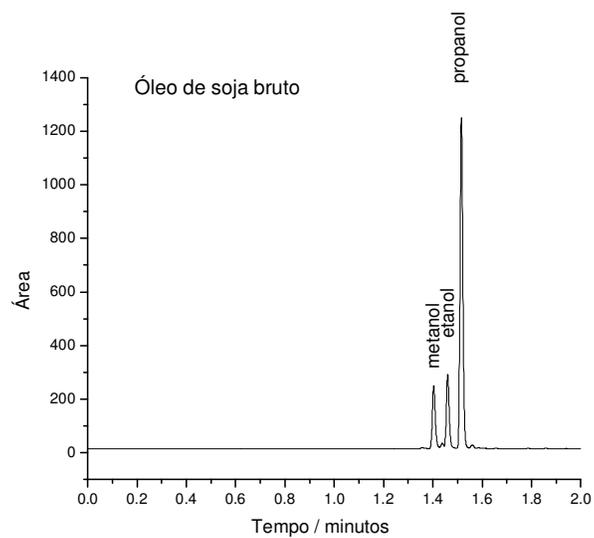


Figura A6. Cromatograma obtido *por GC-FID* para biodiesel de óleo de soja bruto.

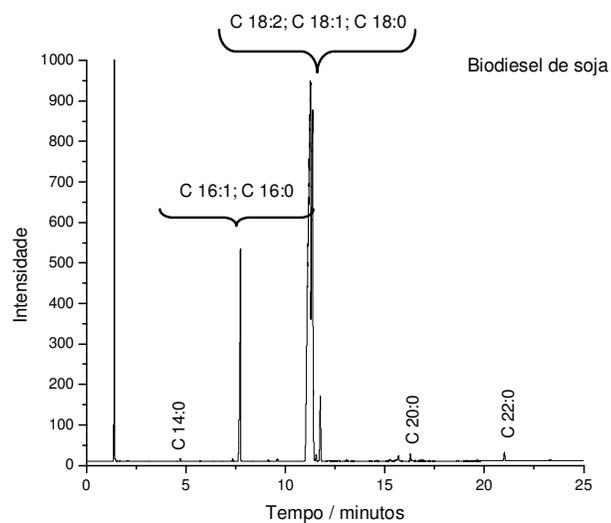


Figura A7. Cromatograma obtido por GC-FID para amostra de biodiesel de soja.

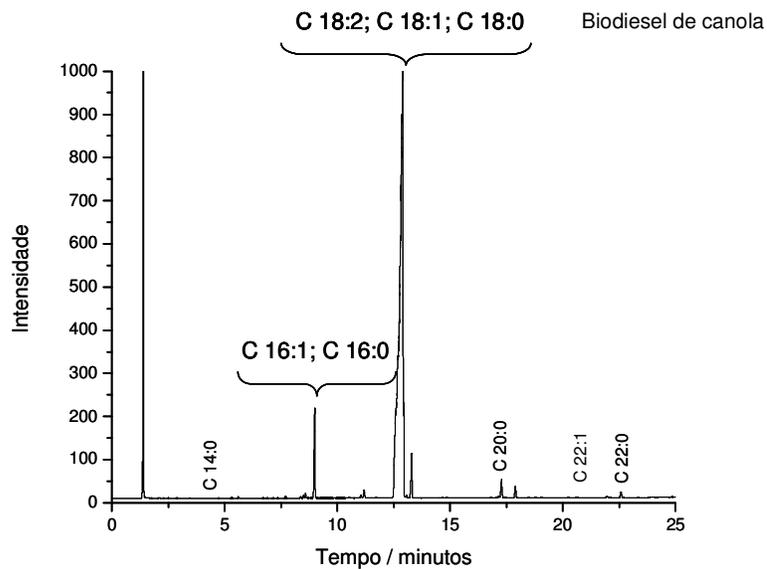


Figura A8. Cromatograma obtido por GC-FID para biodiesel de canola.

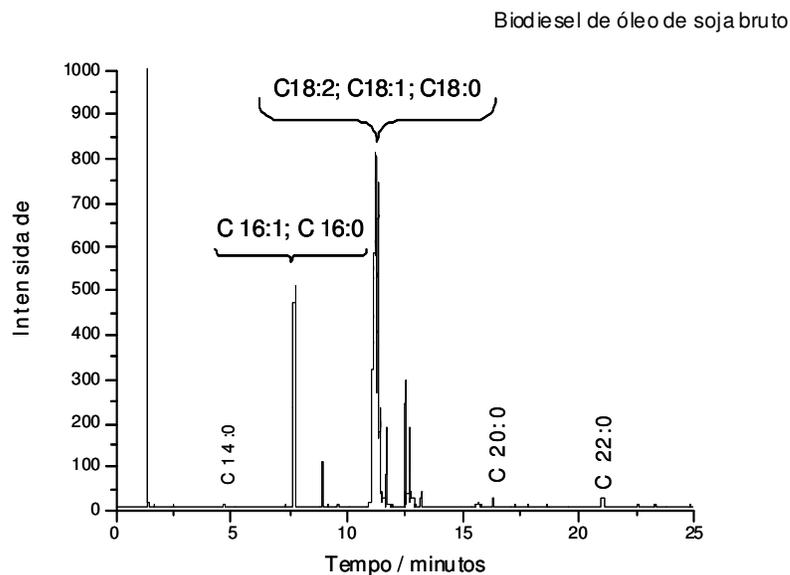


Figura A9. Cromatograma obtido por GC-FID para amostra de biodiesel de óleo de soja bruto.

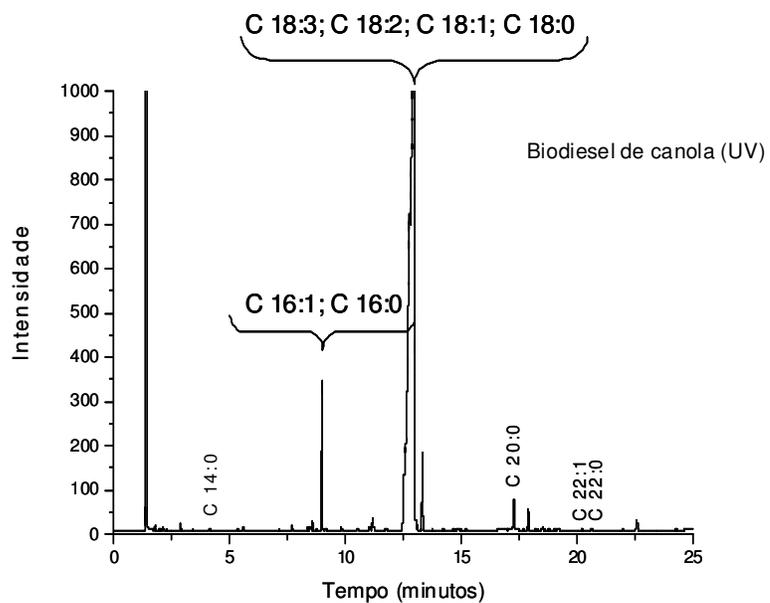


Figura A10. Cromatograma obtido por GC-FID para biodiesel de canola após irradiação UV.

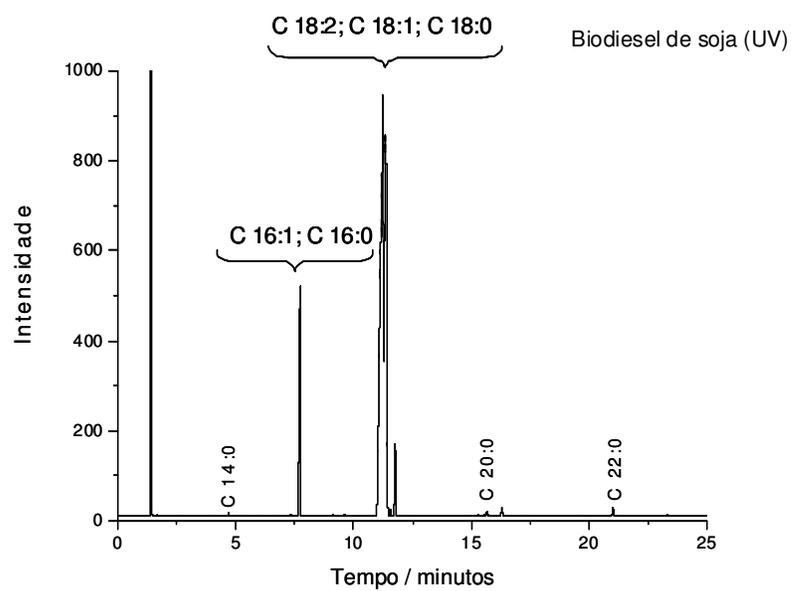


Figura A11. Cromatograma obtido por GC-FID para biodiesel de soja após irradiação UV.

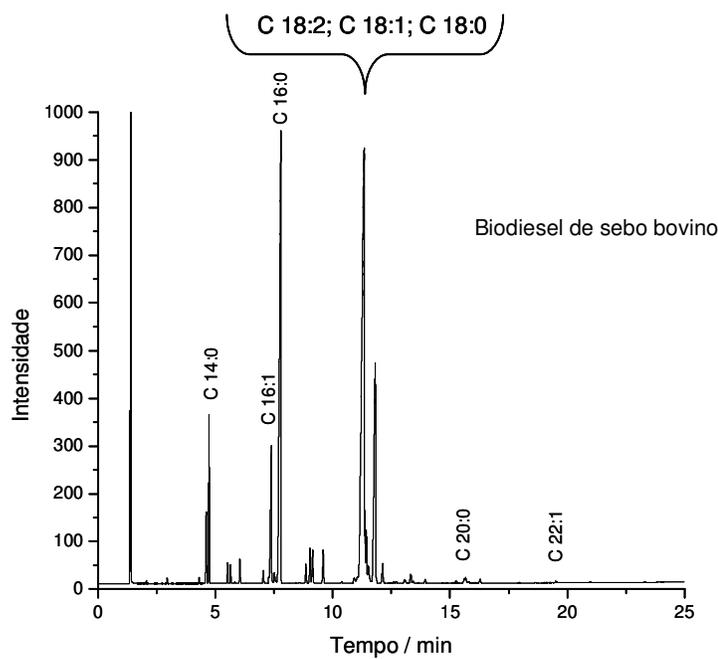


Figura A12. Cromatograma obtido por GC-FID para amostra de biodiesel de sebo bovino.