

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS POR  
ELETROFORESE CAPILAR PARA AVALIAÇÃO DE  
PARÂMETROS QUÍMICOS DA QUALIDADE DE BIODIESEL**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química,  
Departamento de Química,  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Aluno: Marcel Piovezan  
Orientador: Dr. Gustavo Amadeu Micke

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL  
Fevereiro 2010.



**MARCEL PIOVEZAN**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS POR  
ELETROFORESE CAPILAR PARA AVALIAÇÃO DE  
PARÂMETROS QUÍMICOS DA QUALIDADE DE BIODIESEL**

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL  
Fevereiro 2010.

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

P663d Piovezan, Marcel

Desenvolvimento de metodologias por eletroforese capilar para avaliação de parâmetros químicos da qualidade de biodiesel [dissertação] / Marcel Piovezan ; orientador, Gustavo Amadeu Micke. - Florianópolis, SC, 2010.

90 p.: il., grafs., tabs., +; anexos

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências e apêndice

1. Química. 2. Cátions inorgânicos. 3. Monoglicerídeos. 4. Biodiesel. I. Micke, Gustavo Amadeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

***"Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.  
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados."***

*Mahatma Gandhi*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente minha família pelo amor incondicional, pelos esforços, dedicação e principalmente a educação que me deram que me ajudaram a tornar-me muito do que sou hoje. Amo vocês!

Ao Professor Dr.Gustavo Amadeu Micke pela confiança e dedicação ao meu trabalho. Agradeço em especial à sua doação de conhecimento sem limites, acrescentando e lapidando em muito os meus, como ser humano e profissional da área de química.

Um agradecimento mais que especial à Rafaella Trilha, ser humano raro de coração e caráter de ouro. Minha super amiga, muito obrigado por todos estes momentos maravilhosos que compartilhou comigo, seja na alegria ou na dor, nos meus atropelos. Enfim, tudo valeu apena e amigos com certeza dizem: Te amo!!!

À minha mais que companheira de morada de anos, minha amiga Patricia Akemi Tuzimoto (Japa). Tantas coisas passadas juntos, e você sempre com um sorriso no rosto confiante do melhor. Muito obrigado por participar da minha vida e trazer sua doçura.

Aos colegas e amigos do LabEC: Michele, Melina, Daniel, Kaline, Luciano, Thiago, Rafael, Thiele e Andressa pelos momentos passados nestes dois anos de mestrado. Meu muito obrigado à todos!

Ana Carolina Costa pelo apoio, amizade e conhecimento passados durante todo este período no laboratório.

Aos amigos, Ana Cristina, Lucilene, Luana, Elaine e Primo que permanecem e deixaram suas marcas. Muito Obrigado!

Aos membros da banca avaliadora por aceitarem o convite na participação da mesma. Muito obrigado pelas colaborações!

Ao CNPq pela bolsa de mestrado

À *Farma Service* Bioextract pelo apoio financeiro



## SUMÁRIO

<i>RESUMO</i> .....	iii
<i>ABSTRACT</i> .....	iv
<i>LISTA DE FIGURAS</i> .....	v
<i>LISTA DE TABELAS</i> .....	vii
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i> .....	ix

### **Capítulo 1** .....

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	1
1.1. <i>Biodiesel</i> .....	1
1.2. <i>Eletroforese capilar</i> .....	2
1.2.1. <i>Instrumentação</i> .....	2
1.2.2. <i>Fluxo eletrosmótico</i> .....	3
1.2.3. <i>Modos de detecção</i> .....	5
1.2.4. <i>Eletroforese capilar em zona (CZE)</i> .....	6
1.2.5. <i>Dispersão por eletromigração</i> .....	6
<b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	7

### **Capítulo 2: Determinação de potássio, sódio, cálcio e magnésio em biodiesel** .....

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
2.1. <i>Geral</i> .....	13
2.2. <i>Específicos</i> .....	13
<b>3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b> .....	14
3.1. <i>Reagentes e amostras</i> .....	14
3.2. <i>Equipamentos</i> .....	15

3.3. <i>Condição experimental</i> .....	15
3.4. <i>Otimização da extração dos analitos</i> .....	15
3.5. <i>Preparação da amostra</i> .....	17
3.6. <i>Estudo de recuperação dos cátions da matriz</i> .....	18
4. <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	19
4.1. <i>Desenvolvimento do Método</i> .....	19
4.2. <i>Otimização da extração dos analitos das amostras</i> .....	23
4.3. <i>Estudo da conformidade do sistema</i> .....	28
4.3.1. <i>Figuras de mérito</i> .....	28
4.4. <i>Análise de amostras</i> .....	32
5. <b>CONCLUSÕES</b> .....	35
6. <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	36

**Capítulo 3: Desenvolvimento de metodologia para determinação de  $\alpha$ - monoglicérideos em biodiesel** ..... 41

1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	41
2. <b>OBJETIVOS</b> .....	44
2.1. <i>Geral</i> .....	44
2.2. <i>Específicos</i> .....	44
3. <b>METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b> .....	45
3.1. <i>Reagentes e Amostras</i> .....	45
3.2. <i>Equipamentos</i> .....	45
3.3. <i>Condição experimental</i> .....	45
3.4. <i>Preparação da amostra</i> .....	46
3.4.1. <i>Aplicada na avaliação preliminar</i> .....	46
3.4.2. <i>Aplicada no método final</i> .....	46
3.5. <i>Superfície de resposta ternária para otimização da determinação de <math>\alpha</math> - monoglicérideos</i> .....	46

3.6. Curva de calibração de glicerina na presença da mistura ternária etanol/clorofórmio/água .....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
4.1. Determinação de glicerina livre e total .....	50
4.2. Estudos preliminares para determinação dos $\alpha$ – monoglicérides.....	51
4.2.2. Adição de ácido acético à mistura reacional.....	51
4.3. Avaliação da homogeneidade da mistura biodiesel e periodato para determinação de $\alpha$ - monoglicérides.....	53
4.4. Estudo do tempo de reação de $\alpha$ – monoglicérides na mistura ternária .....	57
4.5. Avaliação da curva de calibração .....	57
4.6. Determinação quantitativa de amostras .....	59
5. CONCLUSÕES .....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	64
ANEXO I .....	65
APÊNDICE I .....	66



## RESUMO

O aumento na demanda de biodiesel pelo governo brasileiro com a implementação da mistura B5 (5 % de biodiesel adicionado ao diesel fóssil) além de aumentar a produção de biocombustível do país, reduz os gastos com importação e a emissão de gases responsáveis pelo agravamento do efeito estufa. Neste trabalho foram desenvolvidas duas metodologias analíticas para determinação de parâmetros químicos da qualidade de biodiesel utilizando eletroforese capilar. O primeiro capítulo versa sobre a determinação simultânea dos cátions inorgânicos: sódio, potássio, cálcio e magnésio. Foi utilizado planejamento fatorial fracionário do tipo  $2_v^{5-1}$  para otimização da extração dos analitos da matriz. Os parâmetros de precisão inter-ensaio (RSD %), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para a metodologia desenvolvida corresponderam a 4,58 – 6,88 %; 0,3 mg L<sup>-1</sup>, 1,0 mg L<sup>-1</sup> e 0,999 respectivamente. A faixa de aplicação foi de 0,5 – 20 mg L<sup>-1</sup> para todos os cátions. O estudo de recuperação foi aplicado para avaliar possíveis efeitos de matriz e os resultados variaram na faixa de 88,1–123,0 %. No total oito amostras foram quantificadas e apenas uma teria resultados satisfatórios para comercialização do ponto de vista deste requisito de controle da qualidade. O segundo capítulo trata do desenvolvimento de método para determinação de  $\alpha$  - monoglicerídeos. Foram tomadas estratégias de preparo de amostras para tornar o método simples e rápido, para tanto, utilizou-se gráficos de superfície de mistura ternária formada entre etanol/água/clorofórmio para medidas de turbidez e teor de iodato formado pela reação de íons periodato com os  $\alpha$  - monoglicerídeos. Foi observado que a formação de uma única fase miscível entre amostra e o periodato de sódio mostrou-se essencial no processo reacional, obtendo como resultado melhora nas precisões nas medidas. Quanto aos parâmetros de precisão inter-ensaio (RSD %), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) corresponderam a 6,8–13,6 %; 0,16 mg kg<sup>-1</sup>, 6,28 mg kg<sup>-1</sup> e 0,999 respectivamente. A faixa de aplicação foi de 1,57 – 157 mg L<sup>-1</sup> para glicerina e  $\alpha$  - monoglicerídeos. O método pode ser aplicado para estudos dos mecanismos da transesterificação para produção de biodiesel.

*Palavras chave:* cátions inorgânicos,  $\alpha$  - monoglicerídeos, biodiesel.

## ABSTRACT

The increase in demand for biodiesel by the Brazilian government with the implementation of the B5 blend (5% biodiesel added to fossil diesel) in addition to increasing biofuel production in the country, reduces spending on imports and the emission of gases responsible for greenhouse effect. In this study we developed two analytical methodologies for determination of chemical parameters of quality of biodiesel by capillary electrophoresis. The first chapter deals with the simultaneous determination of inorganic cations sodium, potassium, calcium and magnesium. We used fractional factorial design of type  $2_v^{5-1}$  to optimize the extraction of analytes from the matrix. The parameters of inter-assay precision (RSD%), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and coefficient of determination ( $R^2$ ) for the methodology corresponded to 4.58 to 6.88%, 0.3 mg L<sup>-1</sup>, 1.0 mg L<sup>-1</sup> and 0.999 respectively. The application range was 0.5 - 20 mg L<sup>-1</sup> for all cations. The recovery study was applied to evaluate possible matrix effects and the results varied in the range of 88.1 – 123.0 %. Altogether eight samples were quantified and only one had satisfactory results for the marketing point of view of the requirement of quality control. The second chapter deals with the development of method for determination of  $\alpha$  - monoglycerides. Strategies have been taken for sample preparation was to make simple and fast method to this end, we used graphs of surface ternary mixture consisting of ethanol / water / chloroform for measures of turbidity and the level of iodate formed by the reaction of periodate ions with  $\alpha$  - monoglycerides. It was observed that the formation of a single phase miscible between sample and sodium periodate was essential in the reaction, which results in improved precision in the measurements. Regarding the parameters of inter-assay precision (RSD %), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and coefficient of determination ( $R^2$ ) corresponded to 6.8-13.6%, 0.16 mg kg<sup>-1</sup>, 6.28 mg kg<sup>-1</sup> and 0.999 respectively. The application range was 1.57 to 157 mg L<sup>-1</sup> for glycerin and  $\alpha$  - monoglycerides. The method can be applied to studies of the mechanisms of transesterification for biodiesel production.

*Key words:* Inorganic cations,  $\alpha$  - monoglycerides, biodiesel.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de equipamento de eletroforese capilar. .... 3
- Figura 2.** Formação do fluxo eletrosmótico. .... 4
- Figura 3.** Comparação dos perfis do fluxo eletrosmótico e induzido por pressão em HPLC. .... 4
- Figura 4.** Exemplificação do modo de detecção espectrofotométrico indireto. .... 5
- Figura 5.** Filtro de combustível após queima de biodiesel com baixa concentração de cátions inorgânicos (A) e com alta quantidade de metais (B). Fonte: Adaptado de Rei (2007) [17]. .... 11
- Figura 6.** Curvas de mobilidade efetiva dos analitos. .... 19
- Figura 7.** Avaliação dos parâmetros eletroforéticos utilizando o “software” Peakmaster<sup>®</sup>. Concentração de imidazol 10 mmol L<sup>-1</sup>, Ácido acético 10 - 40 mmol L<sup>-1</sup>. Legenda: mobilidade e EMD (▲ potássio; ■ bário; Δ cálcio; x sódio; ○ magnésio); □ condutividade; ◇ capacidade tamponante. As setas indicam o eixo das ordenadas para cada parâmetro. .... 20
- Figura 8.** Efeito da tensão aplicada na separação dos analitos. .... 22
- Figura 9.** Eletroferograma de mistura de padrões dos cátions em concentração de 5 mg L<sup>-1</sup>. Legenda: 1 – potássio; 2 – bário; 3 – cálcio; 4 – sódio; 5 – magnésio. Condições de análise ver Figura 8. .... 23
- Figura 10.** Correlação das variáveis: massa de biodiesel, ácido acético e agitação para definição da condição ideal de extração dos cátions. .... 266
- Figura 11.** Otimização do tempo de agitação com relação ao fator área analito/padrão interno. Legenda: x – potássio, □ – cálcio, Δ - sódio e ○ – magnésio. Condições de análise ver Figura 8. .... 27

<b>Figura 12.</b> Eletroferograma dos cátions estudados. Legenda: 1 – potássio; 2 – bário; 3 – cálcio; 4 – sódio; 5 – magnésio. (A) mistura de padrões 5 mg L <sup>-1</sup> ; (B) biodiesel de soja e (C) biodiesel de óleo de fritura. Eletrólito composto por 10 mmol L <sup>-1</sup> imidazol, 40 mmol L <sup>-1</sup> ácido acético (pH 4,24). Condições: injeção hidrodinâmica (50 mbar, 5 s), tensão aplicada + 30 kV; 25 °C; detecção indireta em 214 nm.....	34
<b>Figura 13.</b> Representação de $\alpha$ e $\beta$ - monoestearina (C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub> ). .....	42
<b>Figura 14.</b> Espaço experimental da mistura ternária delimitado pela linha pontilhada.....	47
<b>Figura 15.</b> Superfície de resposta da mistura ternária de água, etanol e clorofórmio com relação: (A) Inverso da turbidez e (B) Teor de Iodato. ....	55
<b>Figura 16.</b> Resposta do modelo matemático para teor de iodato relacionado com a proporção de etanol na mistura ternária. Legenda: □ - Água constante; ○ - Clorofórmio constante. ....	56
<b>Figura 17.</b> Estudo do tempo de reação entre periodato e os $\alpha$ – monoglicerídeos em diferentes tempos de agitação na mistura ternária. ....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Especificações das metodologias de análise de cátions inorgânicos em biodiesel.....	12
<b>Tabela 2.</b> Variáveis e níveis investigados no planejamento fatorial fracionário.....	16
<b>Tabela 3.</b> Combinação das variáveis do planejamento fatorial fracionário $2_v^{5-1}$ .....	17
<b>Tabela 4.</b> Mobilidades iônicas e $pK_a$ dos cátions.....	19
<b>Tabela 5.</b> Coeficientes do modelo empírico.....	24
<b>Tabela 6.</b> Adequação do método em desvio padrão relativo RSD (%).28	
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros das curvas.....	29
<b>Tabela 8.</b> Precisão intra e inter - ensaios para os cátions.....	29
<b>Tabela 9.</b> Avaliação da recuperação cátions.....	31
<b>Tabela 10.</b> Comparação de resultados do método proposto e o oficial.32	
<b>Tabela 11.</b> Coeficientes das curvas de regressão da adição de padrão. 32	
<b>Tabela 12.</b> Determinação dos cátions em amostras dado em $mg\ kg^{-1}$ .33	
<b>Tabela 13.</b> Planejamento experimental, partes de cada solvente.....	47
<b>Tabela 14.</b> Composição das misturas para determinação da turbidez e teor de iodato.....	48
<b>Tabela 15.</b> Parâmetros da curva analítica para glicerina.....	50
<b>Tabela 16.</b> Deteminação de $\alpha$ - monoglicerídeos em amostras.....	51

<b>Tabela 17.</b> Dados das curvas de calibração em diferentes composições do solvente da solução de periodato de sódio. ....	52
<b>Tabela 18.</b> Quantificações usando solução de periodato de sódio em H <sub>2</sub> O/HAc (1:9 v/v). ....	52
<b>Tabela 19.</b> Composição da mistura ternária. ....	56
<b>Tabela 20.</b> Parâmetros da curva de glicerina na mistura ternária. ....	58
<b>Tabela 21.</b> Quantificação de $\alpha$ – monoglicerídeos em amostras. ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

a – Coeficiente angular da curva de calibração  
AAS – Espectrometria de absorção atômica  
ANOVA – Análise de variância  
ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis  
AOCS – American Oil Chemist's Society  
ASTM – American Society for Testing and Materials  
b – Coeficiente linear da curva de calibração  
B5 – Diesel adicionado 5 % de biodiesel  
BGE – Eletrólito de corrida  
BSTFA – bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida  
CE – Eletroforese capilar  
CHCl<sub>3</sub> – Clorofórmio  
CZE – Eletroforese capilar de zona  
D.E. - Diâmetro externo  
D.I. - Diâmetro interno  
DAD – Detector de arranjo de diodos  
ELSD – Detector evaporativo com espalhamento de luz  
EMD – Dispersão por eletromigração  
EN – Comité Européen de Normalisation  
F AAS - Espectrometria de absorção atômica de chama  
F AES - Espectrometria de emissão atômica de chama  
FAMES – Metil ésteres de ácidos graxos  
F<sub>cal</sub> – Valor calculado de F  
F<sub>crit</sub> – Valor crítico de F  
FEO – Fluxo eletrosmótico  
FTIR – Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier  
GC – FID – Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama  
GC – MS - Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas  
GL – Glicerina livre  
GPC – Cromatografia de permeação em gel  
GT – Glicerina total  
HAc – ácido acético  
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência  
ICP – OES – Espectrometria de emissão atômica por plasma Indutivamente acoplado  
kV – quilo volt  
LC – Cromatografia líquida

LIF – Fluorescência Induzida por Laser  
LOD – Limite de detecção  
LOQ – Limite de quantificação  
mAU – mili unidade de absorvância  
mg L<sup>-1</sup> – miligrama por litro  
MS – Espectrômetro de massas  
MSTFA – N-Metil-N-trifluoroacetamida  
N – Número de pratos  
nL – nanolitro  
nm – nanômetro  
pH – Potencial hidrogeniônico  
pK<sub>a</sub> – logaritmo da constante de ionização ácida  
R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação  
rpm – rotações por minuto  
Rs – Resolução  
RSD % - Desvio padrão relativo percentual  
TFA – Ácido trifluoroacético  
TLC – Cromatografia de camada delgada  
UV – Vis – Ultravioleta visível  
 $\alpha_j$  – fração molar do analito  
 $\mu_{ef}$  – mobilidade efetiva  
 $\mu_i$  – mobilidade iônica  
 $\mu_j$  – mobilidade iônica do analito

## Capítulo 1

### 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1. Biodiesel

A invenção do motor alimentado por óleo vegetal de Rudolf Diesel datados de 1900, só veio a luz em 1980 com a exploração de biodiesel. Tal fato aconteceu como resultado de um interesse em fontes renováveis de energia para reduzir emissões de gases do efeito estufa, e aliviar o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis [1].

Biodiesel (alquil ésteres de ácidos graxos) é um combustível diesel alternativo derivado da reação de óleos vegetais ou gordura animal e álcool com ou sem a presença de um catalisador [1]. De acordo com o Decreto N<sup>o</sup> 5.297 de 6 de dezembro de 2004 e da Lei N<sup>o</sup> 11.097, de 13 de janeiro de 2005 define o biodiesel como [2, 3]:

*“Combustível para 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”.*

A grande vantagem está ligada principalmente às propriedades físico - químicas do biodiesel que fazem com que as mudanças mecânicas nos automóveis sejam mínimas, ou praticamente desnecessárias [4].

O interesse da comunidade científica na produção de biodiesel abrange uma infinidade de matérias – primas, dentre as quais destacam – se o óleo de soja, girassol, palma, amendoim, milho, canola, algodão [5] e colza [6]. Outras fontes são gordura animal [4], óleo de fritura [7] e microalgas [8].

A partir de 1<sup>o</sup> de janeiro de 2010, passou a ser obrigatória a mistura de 5% de biodiesel (B5) em todo óleo diesel consumido no Brasil, exceto óleo diesel marítimo. Para os atuais dados de mercado, a nova mistura deverá gerar economia de divisas da ordem de US\$ 1,4 bilhão ao ano devido à redução das importações de óleo diesel. Segundo estudo realizado pela ANP, cada litro da nova mistura diminui em 3% a emissão de CO<sub>2</sub>, além de reduzir também a emissão de material particulado [9]. Os novos requisitos estabelecidos pela ANP para o ano de 2010 acarretam na maior produção de biodiesel, tendo como consequência a

necessidade de metodologias analíticas adequadas para o controle da qualidade química deste biocombustível.

## *1.2. Eletroforese capilar*

A inserção da eletroforese como técnica de separação deu - se no início da década de 30 por Tiselius, pela separação parcial de proteínas do soro sanguíneo [10].

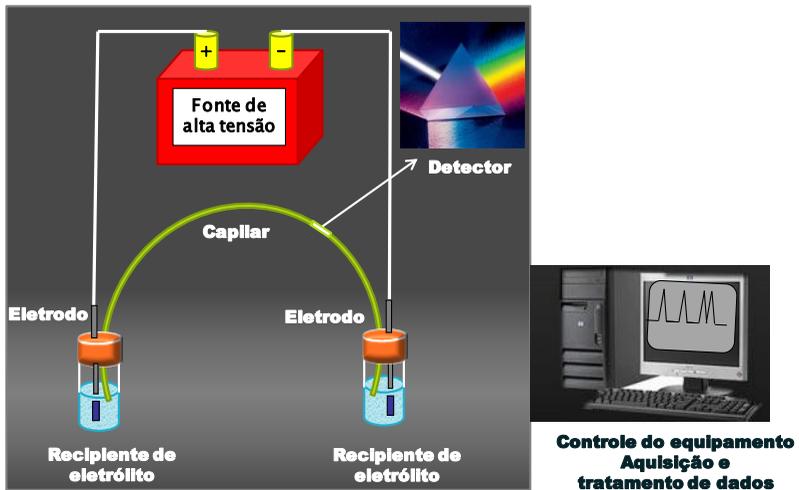
A eletroforese capilar (CE) foi idealizada por Hjertén em 1967. Os primeiros trabalhos foram publicados na década de 70, entretanto, a primeira análise desenvolvida com sucesso foi publicada por Everaerts e colaboradores em 1979, seguida de Jorgenson e Lukacs em 1981[11].

Eletroforese capilar é definida como uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis pela ação de campo elétrico [10]. Destaca - se pela rapidez, baixo custo por análise, gasto mínimo de reagentes e solventes e pouquíssima quantidade de amostra requerida, na ordem de nanolitros (nL)[12]. As suas aplicações são encontradas em inúmeras áreas passando, por exemplo pela química [13], farmacêutica [14], alimentícia [15], médica [16] e forense [17].

As vantagens da CE estão ainda, no alto poder de separação, completa automação da análise, com possibilidades de injeção (hidrodinâmica e eletrocínética) e detecção em fluxo [10]. A versatilidade da técnica permite a compatibilidade com diferentes tipos de detectores. Dentre os mais utilizados estão o UV – Vis [14,15], fluorescência [18], fluorescência induzida por laser – LIF [19], condutométrico [20] e espectrômetro de massas – MS [21].

### *1.2.1. Instrumentação*

O equipamento comercial de eletroforese é relativamente simples (Figura 1). Consiste em uma fonte de alta tensão, um capilar normalmente de sílica fundida (com diâmetro interno de 15 a 100  $\mu\text{m}$  e comprimento entre 30 e 150 cm), dois eletrodos de platina que entram em contato com os recipientes que contém os eletrólitos de corrida ou amostras, um detector e computador para aquisição dos dados.



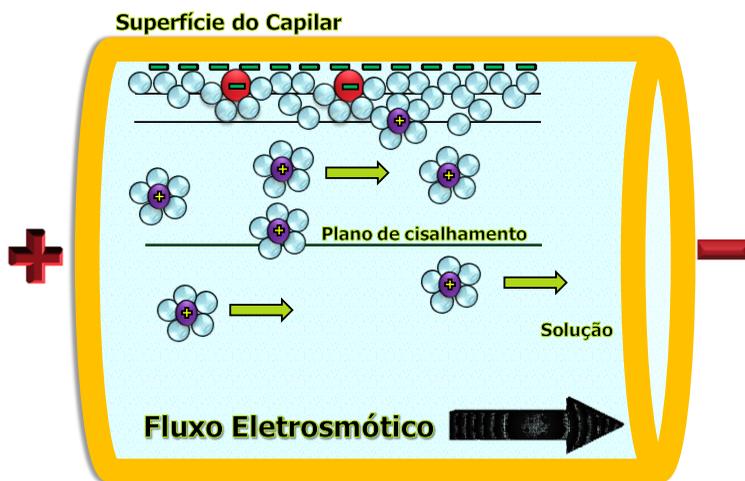
**Figura 1.** Esquema de equipamento de eletroforese capilar.

A injeção da amostra pode acontecer de forma hidrodinâmica e ou eletrocinética. Na hidrodinâmica, o analito é introduzido no capilar através da aplicação de pressão, definida por um período de tempo no recipiente do analito. Já a injeção eletrocinética, ocorre pela aplicação de uma diferença de potencial em tempo determinado no reservatório onde se encontra o analito. Após a injeção, o recipiente contendo o eletrólito retorna a extremidade do capilar, onde é aplicada uma diferença de potencial através do capilar ocorrendo separação e posterior detecção em fluxo [10].

### 1.2.2. Fluxo eletrosmótico

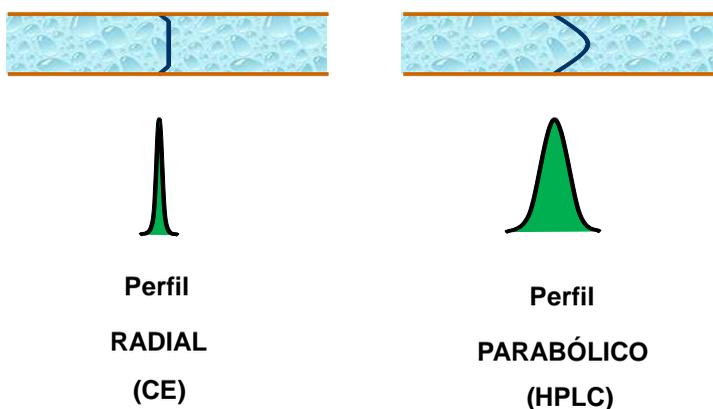
Um fenômeno que ocorre em CE é o fluxo eletrosmótico (FEO). Este fluxo (Figura 2) é gerado no interior do capilar de sílica preenchido com uma solução tampão. No capilar de sílica encontram-se os grupos silanóis ( $\text{Si-OH}$ ). Dependendo do pH do meio (acima de  $\text{pH} = 3$ ) estes são ionizados, liberando prótons que por sua vez são solvatados por moléculas de água, deixando a parede do capilar carregada negativamente [22]. Os cátions presentes na solução formam uma dupla camada elétrica pela interação com a parede do capilar. Ao aplicar uma diferença de potencial no capilar, os cátions presentes no seio da solução migrarão para o eletrodo de carga oposta (cátodo). Por estarem solvata-

dos estes induzem um movimento da solução como um todo dentro do capilar, gerando assim o fluxo eletrosmótico.



**Figura 2.** Formação do fluxo eletrosmótico.

A eletrosmose induz um fluxo de perfil plano, perpendicular ao capilar, diferente do perfil parabólico da cromatografia líquida (Figura 3). O perfil do FEO contribui para a formação de picos com eficiência muitas vezes melhores que em cromatografia líquida.



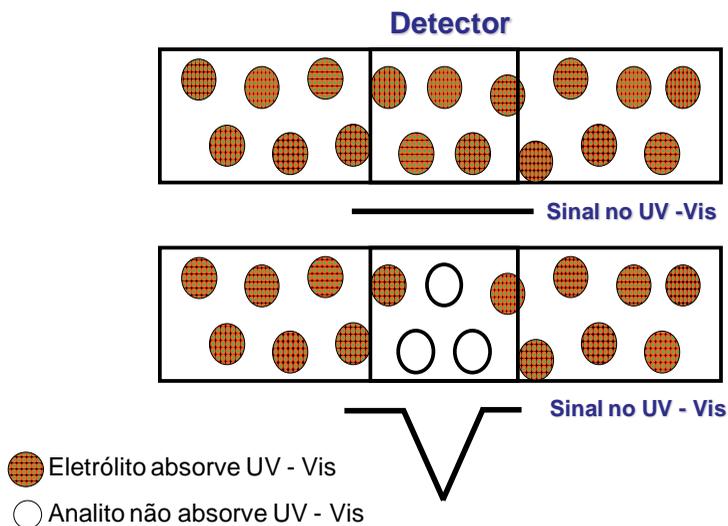
**Figura 3.** Comparação dos perfis do fluxo eletrosmótico e induzido por pressão em HPLC.

### 1.2.3. Modos de detecção

A escolha de um detector adequado para aplicações quantitativas deve estar ligada às características do analito em estudo. Os detectores comumente disponíveis em CE são baseados em medição da absorvância UV -Visível. O emprego destes detectores está atrelado na medida direta da absorção e torna-se limitado aos compostos que têm absorvidade molar relativamente elevada. [23]

Muitos íons inorgânicos têm insignificante absorvância nos comprimentos de onda útil e deve ser excluído o uso da detecção de absorção direta. Substâncias que não têm apreciável absorção no UV -Vis não poderiam ser detectadas, no entanto, o modo de detecção espectrofotométrica indireta pode ser utilizado, sendo amplamente aplicado para detecção de cátions e ânions inorgânicos [20].

Este modo de detecção opera pelo deslocamento de um íon absorvente (presente no eletrólito de corrida) por um íon do analito que possua mesma carga do absorvente. Como resultado é observado o decréscimo do sinal que pode ser detectado e quantificado [24]. Estas descrições geram eletroferogramas exemplificados na Figura 4.



**Figura 4.** Exemplificação do modo de detecção espectrofotométrico indireto.

#### *1.2.4. Eletroforese capilar em zona (CZE)*

A eletroforese capilar em zona (CZE) é um dos modos de separação mais usados em eletroforese capilar, devido principalmente pela facilidade de sua implementação e otimização das condições experimentais [12].

A separação em CZE consiste em introduzir a amostra num tubo capilar na presença de uma solução tampão, no qual é aplicada uma diferença de potencial. Após a geração de um campo elétrico ao longo do tubo capilar, os componentes da amostra migram com velocidade constante, independentemente uns dos outros, como consequência de suas mobilidades [25]. A separação acontece como resultado de dois fatores: maximizar as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos e minimizar as causas de alargamento das zonas [12].

#### *1.2.5. Dispersão por eletromigração*

Uma das causas de alargamento das zonas é dispersão por eletromigração (EMD) que ocorre devido a uma diferença de intensidade do campo elétrico entre a zona do analito e do eletrólito de corrida (BGE) [26].

A EMD pode ser reduzida em um nível aceitável, selecionando-se um co - íon (componente do eletrólito com mesma carga do analito) que apresente mobilidade iônica próxima a do analito de interesse. O resultado da escolha adequada do co - íon é a obtenção de um pico eletroforético simétrico, não comprometendo a eficiência.

A eletroforese capilar apresenta inúmeras vantagens úteis para desenvolvimento e aplicação em análises químicas. Do ponto de vista de análises de rotina, destacam-se a rapidez, minimização dos gastos por análise e total automatização.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] JANAUN J.; ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 14, p. 1312–1320, 2010.
- [2] BRASIL. Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636 de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. Presidente da República, Casa Civil, Sub Chefia para Assuntos Jurídicos, 2005b.
- [3] BRASIL. Decreto 5.297, de 6 de janeiro de 2004. Dispõe sobre os coeficientes de redução das alíquotas de contribuição para o PIS/PASEP e da COFINS incidentes na produção e comercialização de biodiesel, sobre os termos e as condições para a utilização das alíquotas diferenciadas, e dá outras providências. Ministério de Minas e Energia, 2004.
- [4] BHATTI, H. N.; HANIF, M. A.; QASIM, M.; REHMAN, A. Biodiesel production from waste tallow. *Fuel*, v. 87, p. 2961–2966, 2008.
- [5] LEUNG D. Y.C.; WU, X.; LEUNG, M.K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, v.87, p. 1083-1095, 2010.
- [6] ZABETI, M.; DAUD, W. M. A. W.; AROUA, M. K. Activity of solid catalysts for biodiesel production: A review. *Fuel Processing Technology*, v. 90, p. 770–777, 2009.
- [7] KNOTHE, G.; STEIDLEY, K. R. A comparison of used cooking oils: A very heterogeneous feedstock for biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5796 - 5801, 2009.
- [8] HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.W.; CHEN, G. Biodiesel production by microalga biotechnology. *Applied Energy*, v. 87, p. 38-46, 2010.
- [9] ANP. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acessado em: 10 de jan. de 2010.

- [10] TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: Conceitos básicos. *Quím. Nova*, v. 19 (2), p. 173 – 181, 1996.
- [11] SANTOS, M. R.; TAVARES, M. F. M.; RUBIM, J. C. Implementação de um sistema de eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser. *Quím. Nova*, v. 23 (5), p. 585 – 589, 2000.
- [12] TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Quím. Nova*, v. 20 (5), p. 493 – 511, 1997.
- [13] ITO, K.; HIROKAWA, T. Separation of alkali and alkaline-earth metal and ammonium cations by capillary electrophoresis using poly(ethylene glycol) and tartaric acid. *J. Chromatogr. A*, v. 742, p.
- [14] MICKE, G. A.; COSTA, A. C. O.; HELLER, M.; BARCELLOS, M.; PIOVEZAN, M.; CAON, T.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol—Total analysis time reduction strategies. *J. of Chromatogr. A*, v. 1216, p. 7957-7961, 2009.
- [15] COSTA, A. C. O.; PERFEITO, L. S.; TAVARES, M. F. M.; MICKE, G. A. Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis—Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. *J. Chromatogr. A*, v. 1204, p. 123–127, 2008.
- [16] ALTRIA, K. D. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 856, p. 443 - 463, 1999.
- [17] KISHI, T.; NAKAMURA, J.; ARAI, H. Application of capillary electrophoresis for the determination of inorganic ions in trace explosives and explosive residues. *Electrophoresis*, v. 19, p. 3 – 5, 1998.
- [18] COBLE, P. G.; TIMPERMAN, A. T. Fluorescence detection of proteins and amino acids in capillary electrophoresis using a post-column sheath flow reactor *Journal of Chromatography A*, v. 829, p. 309 - 315, 1998.
- [19] DESCROIX, S.; LE POTIER, I.; NIQUET, C.; MINC, N.; VIOVY, J. L.; TAVERNA, M. In-capillary non-covalent labeling of insulin and

one gastrointestinal peptide for their analyses by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. of Chromatogr. A*, v. 1087, p. 203 – 209, 2005.

[20] KUBÁŇ, P.; KUBÁŇ, P.; KUBÁŇ, V. Simultaneous determination of inorganic and organic anions, alkali, alkaline earth and transition metal cations by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection. *Electrophoresis*, v. 23, p. 3725 – 3734, 2002.

[21] MOSELEY, M. A. Determination of bioactive peptides using capillary zone electrophoresis mass - spectrometry, *Analytical Chemistry*, v. 63, p. 109 - 114, 1991.

[22] SKOOG, D. A.; WEST, D. M; HOLLER, F. J. Analytical chemistry: an introduction. 6th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1994. 612 p.

[23] PADARAUSKAS, A. Derivatization of inorganic ions in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 24, p. 2054 – 2063, 2003.

[24] JOHNS, C.; MACKA, M.; HADDAD, P. R. Highly sensitive indirect photometric detection of cations by capillary electrophoresis with the cationic dye chrysoidine. *J. Chromatogr. A*, v. 997, p. 87–94, 2003.

[25] SILVA, J.A.F. *et. al.* Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Quím. Nova*. v. 30 (3), p. 740-744, 2007.

[26] GAŠ, B.; ŠTĚDRÝ, M.; KENNDLER, E. *Electrophoresis*, v. 18, p. 2123-2133, 1997.

## Capítulo 2

### Determinação de potássio, sódio, cálcio e magnésio em biodiesel

#### 1. INTRODUÇÃO

Um dos parâmetros para atestar a qualidade do biodiesel é a quantidade de metais alcalinos (K e Na) e alcalinos terrosos (Ca e Mg) presentes no produto final. Estes íons encontram-se presentes por serem adicionados no processo de síntese do biodiesel como catalisadores.

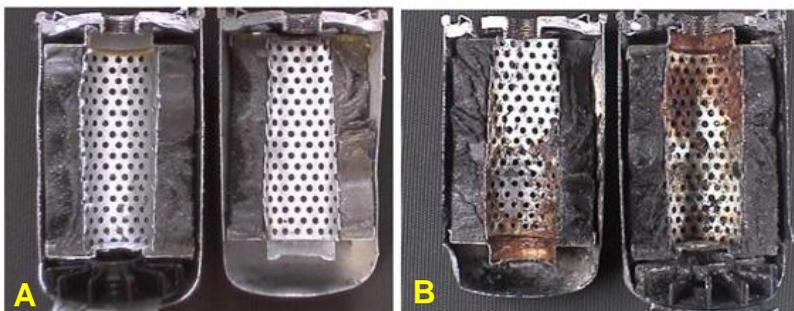
A transesterificação alcalina é preferível à catálise ácida por apresentar altas taxas de conversão e baixas temperaturas reacionais [1], além de ser 4000 vezes mais rápida que a catalisada por ácido [2, 3].

Os catalisadores alcalinos classificados como homogêneos, são aqueles que se encontram solubilizados na solução reacional [4], como hidróxidos de potássio, sódio e magnésio [5], sendo os mais amplamente utilizados devido ao seu baixo custo e altos rendimentos do produto final. No entanto, catalisadores homogêneos demandam processos de neutralização e de separação da mistura do produto final, os quais implicam em gastos de água, solventes e energia [3].

Para reduzir estes efeitos, catalisadores heterogêneos caracterizados por não serem consumidos ou dissolvidos no meio reacional [6] tais como complexos metálicos [7], óxidos metálicos, como o óxido de cálcio [8, 9], óxido de magnésio [5, 10], óxido de zircônio [11] e catalisadores suportados [12] foram investigados.

Catalisadores heterogêneos qualificam-se pela separação sem uso de solventes, e fácil regeneração do catalisador, obtendo um produto final menos corrosivo em um processo mais seguro, barato e ambientalmente adequado [3].

A presença de metais alcalinos em biodiesel acarreta inúmeros problemas desde a decomposição do combustível [13], diminuição do tempo de vida útil do motor pela formação de sólidos abrasivos (Figura 5), entupimento de injetores e filtros [14, 15] e problemas ambientais [16]. Sua presença está relacionada à eficiência do processo de lavagem do biodiesel [14].



**Figura 5.** Filtro de combustível após queima de biodiesel com baixa concentração de cátions inorgânicos (A) e com alta quantidade de metais (B). Fonte: Adaptado de Rei (2007) [17].

Segundo a norma brasileira ANP, Resolução nº 7 de 19 de março de 2008 [18], a quantidade máxima permitida para a soma (K + Na) e (Ca + Mg) não deve ultrapassar  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. De acordo com esta norma, as metodologias padronizadas para determinação de sódio e potássio são, respectivamente pelas normas Européia EN 14108 e EN 14109 pelo uso da técnica de espectrometria de absorção atômica (AAS) e ainda, sódio, potássio, cálcio e magnésio pela norma EN 14538 pela técnica de espectrometria de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP – OES).

Em artigo de revisão Korn e colaboradores [19] destacam o uso de técnicas de absorção atômica na determinação de cátions metálicos em combustíveis, em especial biodiesel. Recentemente, Monteiro e colaboradores [16] revisaram as diferentes técnicas analíticas utilizadas para determinação dos parâmetros da qualidade de biodiesel. Dentre as técnicas mais aplicadas destacam-se a aplicação de: ICP – OES [20, 21], F AAS [15], F AES [13, 22] e potenciometria [14]. Na Tabela 1, constam especificações destas metodologias.

**Tabela 1.** Especificações das metodologias de análise de cátions inorgânicos em biodiesel.

<i>Análitos</i>	<i>Técnica</i>	<i>Preparo da amostra</i>
<b>Ca, K, Mg, Na e P</b>	ICP - OES	Amostras preparadas pela adição de 4 g de óleo base para 10 g de amostras de biodiesel e diluída para 40 g com querosene <sup>[20]</sup>  Diluição direta de 2,5 g das amostras com 25 mL de etanol, e adição de padrão interno Y(III) <sup>[21]</sup>
<b>Na e K</b>	F AAS	Análises realizadas por microemulsão. Preparação da microemulsão com 57,6 % de <i>n</i> -pentanol ou <i>n</i> -butanol, 20% de biodiesel ou óleo vegetal, 14,4% de Triton X-100 e 8% de água (1,4 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> ) <sup>[15]</sup>
<b>Na e K</b>	F AES	Análises realizadas por microemulsão. Preparação da microemulsão pela mistura de 0,5 g de biodiesel, 0,4 mL de Cs (5 % m/v), 100 µL de HCl e <i>n</i> – propanol para volume final de 10 mL <sup>[22]</sup>
<b>Na</b>		Pesagem de 0,5 g de biodiesel e decomposição seca em duas etapas: 250 °C mantida por 1 h, seguida de 600 °C mantida por 4 h. As cinzas são dissolvidas com solução de HNO <sub>3</sub> (1,0% v / v) para volume final de 100 mL <sup>[13]</sup>
<b>K</b>	Potenciometria	Extração líquido – líquido com solução HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> <sup>[14]</sup>

Muitos dos métodos vistos na literatura não determinam simultaneamente Na, K, Ca e Mg, utilizando-se de procedimentos de preparo de amostra laboriosos e demorados, bem como a utilização de inúmeros reagentes e solventes orgânicos tóxicos.

Para tanto, eletroforese capilar (EC) vem demonstrando seu potencial analítico para determinação de parâmetros químicos de biodiesel [23], não só pela qualidade de seus resultados e versatilidade, mas pelo gasto mínimo de solventes e reagentes, análises rápidas, reprodutíveis e principalmente de baixo custo comparada a outras técnicas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Desenvolver um método analítico utilizando eletroforese capilar para determinação simultânea dos cátions inorgânicos: sódio, potássio, cálcio e magnésio em biodiesel.

### 2.2. Específicos

Utilizar programas de simulação para definição das condições do método de separação eletroforético;

Otimizar a extração dos analitos da matriz biodiesel, utilizando planejamento multivariado do tipo fatorial fracionário  $2_v^{5-1}$ ;

Avaliar parâmetros de mérito da metodologia proposta;

Aplicar a metodologia proposta na determinação dos cátions inorgânicos em amostras de biodiesel de diferentes matérias – primas.

### 3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

#### 3.1. Reagentes e amostras

Todos os reagentes utilizados na preparação do eletrólito e as soluções padrões foram de grau analítico. Ácido acético glacial, 98% (Synth, SP, Brasil) e imidazol (Merck, RJ, Brasil), os padrões dos cátions: sódio ( $\text{NaNO}_3$ , Riedel-de Haën), potássio ( $\text{KIO}_3$ ), cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), magnésio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e bário ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), e solvente clorofórmio (Synth, SP, Brasil).

Soluções estoque de imidazol ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e ácido acético ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foram preparadas em água desionizada (desionizador Mili-Q, Milipore, Bedford, MA, E.U.A.). Os sais dos padrões foram secos em estufa a  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 horas, deixados em dessecador até temperatura ambiente e acondicionados em frascos com tampa. A solução estoque composta dos padrões sódio, potássio, cálcio e magnésio ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi preparada separadamente da solução do padrão interno bário ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). Todas as soluções foram armazenadas sob refrigeração a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

O eletrólito de corrida consistiu da mistura de imidazol ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e ácido acético ( $40 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em pH 4,24.

Para construção das curvas de calibração, os analitos foram preparados pela diluição das soluções estoque.

As amostras de biodiesel de soja, de soja usado em frituras e mamona, foram fornecidas por empresas locais e outros laboratórios de pesquisa desta Universidade. Uma amostra de óleo de soja foi também avaliada.

### 3.2. Equipamentos

Os procedimentos analíticos foram desenvolvidos no equipamento de Eletroforese Capilar da marca Agilent Technologies modelo HP <sup>3D</sup>CE (Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD). As análises foram efetuadas a 25 °C em capilar de sílica fundida revestida externamente com poliimida (32,5 cm x 50 µm D.I. x 375 µm D.E.) da marca Polymicro Technologies (Phenix, USA). Foram utilizados mesa agitadora orbital da marca Dist, modelo DI-10 (Santa Catarina, Brasil), sonicador da marca Unique, modelo ultra cleaner 700 (São Paulo, Brasil) e centrífuga da marca Centribio (São Paulo, Brasil).

### 3.3. Condição experimental

O primeiro condicionamento do capilar foi realizado a 25 °C passando-se solução de NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>) por 30 minutos, seguido de lavagem com água desionizada por 30 minutos, por fim, 20 minutos com o eletrólito de corrida utilizado para a análise. O condicionamento do capilar entre as análises foi de 0,8 minutos a pressão de 50 mbar com eletrólito de corrida. A injeção das soluções padrão e amostras foram realizadas pelo “inlet” (extremidade do capilar mais afastada do detector), injeção hidrodinâmica a pressão de 50 mbar por 5 segundos. A separação dos analitos foi transcorrida em voltagem positiva aplicada de 30 kV, em tempo inferior a 0,7 minutos. A detecção no UV foi efetuada de forma indireta em 214 nm. Os dados foram então adquiridos e tratados pelo “software” *HP Chemstation*.

### 3.4. Otimização da extração dos analitos

A otimização da extração dos cátions foi objeto de estudo, por existirem inúmeras variáveis no processo que podem influenciar na qualidade dos resultados e na aplicabilidade do método proposto. Para tanto, a otimização multivariada foi escolhida como ferramenta. Foi aplicado o planejamento fatorial fracionário com ponto central do tipo  $2_v^{5-1}$ , primeiramente para avaliar a significância das variáveis, bem como, as interações entre elas. As variáveis investigadas foram: massa de amostra, quantidade de ácido acético, volume da fase extratora, tempo de agitação e tempo de sonicação. As variáveis investigadas e os níveis correspondentes são apresentados na Tabela 2. Todas as variáveis foram avaliadas em dois níveis, um baixo (denotado por -1) e um alto (denotado por +1). O ponto central (denotado por 0) foi realizado em triplicata

para estimativa da variância experimental e averiguação da perda de linearidade entre os níveis para cada variável. A resposta para o planejamento foi gerada a partir do produto do fator área dos analitos pelo padrão interno (área analito/ área do padrão interno) em cada condição, de acordo com a Equação 1. O padrão interno (bário) foi adicionado junto com a fase extratora em concentração de 5 mg L<sup>-1</sup>.

$$Resposta = \left( \frac{K.Na.Ca.Mg}{Ba} \right) \quad (1)$$

Foram realizados 16 experimentos e triplicata do ponto central. As respostas geradas pela Equação 1 para cada condição foram tratados no “software” *Design – Expert 7.1.6 Trial*.

**Tabela 2.** Variáveis e níveis investigados no planejamento fatorial fracionário.

<i>Variável</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>+1</i>
<b>Massa de biodiesel (mg)</b>	200	400	600
<b>Ácido acético (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	0	5	10
<b>Volume de fase extratora (µL)</b>	200	400	600
<b>Agitação (min)</b>	5	10	20
<b>Sonicação (min)</b>	0	2	4

O planejamento fatorial do tipo 2<sub>v</sub><sup>5-1</sup> foi aplicado para as cinco variáveis envolvidas. A combinação dos níveis das variáveis são apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Combinação das variáveis do planejamento fatorial fracionário  $2_v^{5-1}$ .

<i>Ensaio</i>	<i>Massa de biodiesel (mg); (M)</i>	<i>Volume de fase extratora (<math>\mu</math>L); (V)</i>	<i>Ácido acético (<math>mmol L^{-1}</math>); (Ac)</i>	<i>Agitação (min.); (A)</i>	<i>Sonicação (min.); (S)</i>
<b>1</b>	1	-1	-1	1	1
<b>2</b>	0	0	0	0	0
<b>3</b>	1	1	1	1	1
<b>4</b>	-1	1	1	1	-1
<b>5</b>	1	-1	-1	-1	-1
<b>6</b>	-1	-1	1	1	1
<b>7</b>	0	0	0	0	0
<b>8</b>	1	-1	1	-1	1
<b>9</b>	-1	-1	-1	1	-1
<b>10</b>	1	-1	1	1	-1
<b>11</b>	1	1	-1	1	-1
<b>12</b>	-1	1	-1	1	1
<b>13</b>	0	0	0	0	0
<b>14</b>	1	1	1	-1	-1
<b>15</b>	-1	1	-1	-1	-1
<b>16</b>	-1	-1	-1	1	1
<b>17</b>	-1	1	-1	1	1
<b>18</b>	-1	-1	-1	-1	-1
<b>19</b>	1	1	-1	-1	1

A qualidade da extração com relação à agitação foi testada em tempos variando de 5 – 60 minutos. Foram pesados em frasco com tampa de 2 mL aproximadamente 200 mg de biodiesel e adicionados 200  $\mu$ L de água com padrão interno bário ( $5 mg L^{-1}$ ), os frascos foram mantidos sob agitação de acordo com cada tempo em estudo. Posteriormente foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos e transferidos 150  $\mu$ L da fase aquosa para frasco e analisados por CE.

### 3.5. Preparação da amostra

Foram pesados em balança analítica, aproximadamente 200 mg de biodiesel em um tubo de 2 mL com tampa. Adicionou – se 200  $\mu$ L de

água com padrão interno em concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . O tubo foi vigorosamente agitado por 20 minutos e centrifugado por 10 minutos em velocidade de 2000 rpm. Após a centrifugação foram transferidos  $150 \mu\text{L}$  da fase aquosa para um frasco e analisados por eletroforese capilar.

### *3.6. Estudo de recuperação dos cátions da matriz*

Em quatro frascos de 15 mL foram pesados aproximadamente 2000 mg de biodiesel e adicionados  $100 \mu\text{L}$  de soluções dos padrões cátions para compreender os níveis de concentração na massa de biodiesel de 1,0; 2,0; 5,0 e  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Após agitação vigorosa, foram pesados aproximadamente 200 mg de biodiesel incorporado de padrões em frascos de 2 mL. Adicionou-se  $200 \mu\text{L}$  de água com padrão interno em concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . O tubo foi vigorosamente agitado por 20 minutos e centrifugado por 10 minutos em velocidade de 2000 rpm. Após a centrifugação foram transferidos  $150 \mu\text{L}$  da fase aquosa para um frasco e analisados por eletroforese capilar.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Desenvolvimento do Método

Utilizando dados de  $pK_a$  e mobilidade iônica ( $\mu_i$ ) dos analitos [24, 25] (Tabela 4), e aplicando a Equação 2, foram construídas curvas de mobilidade efetiva ( $\mu_{ef}$ ) em função do pH (Figura 6).

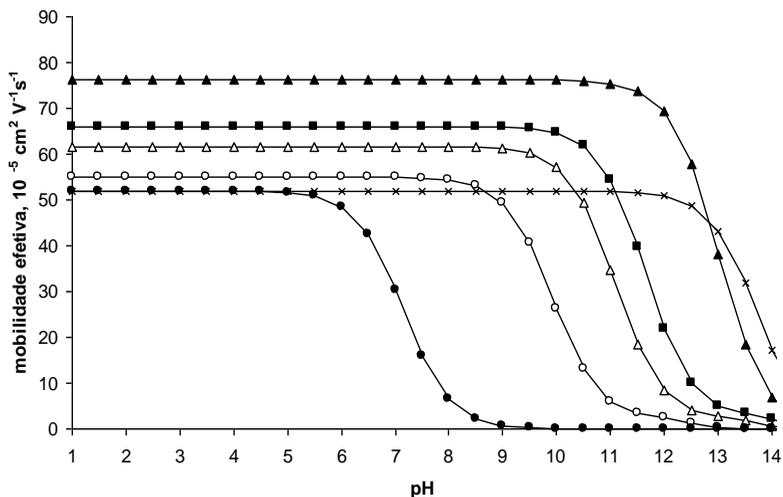
**Tabela 4.** Mobilidades iônicas e  $pK_a$  dos cátions.

Analitos	$\mu_1^a$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$pK_{a1}$	$\mu_2^b$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$pK_{a2}$
<b>Potássio</b>	76,2	13,00		
<b>Bário</b>	33,0	13,7	66,0	13,2
<b>Cálcio</b>	30,9	13,60	61,7	12,60
<b>Magnésio</b>	27,5	12,20	55,0	11,40
<b>Sódio</b>	51,9	13,70		

<sup>a</sup> mobilidade de cátion monovalente; <sup>b</sup> mobilidade de cátion divalente.

$$(\mu_{ef}) = \sum (\mu_j \cdot \alpha_j) \quad (2)$$

onde,  $\alpha_j$  é a fração molar do analito e  $\mu_j$  é a mobilidade iônica do analito.

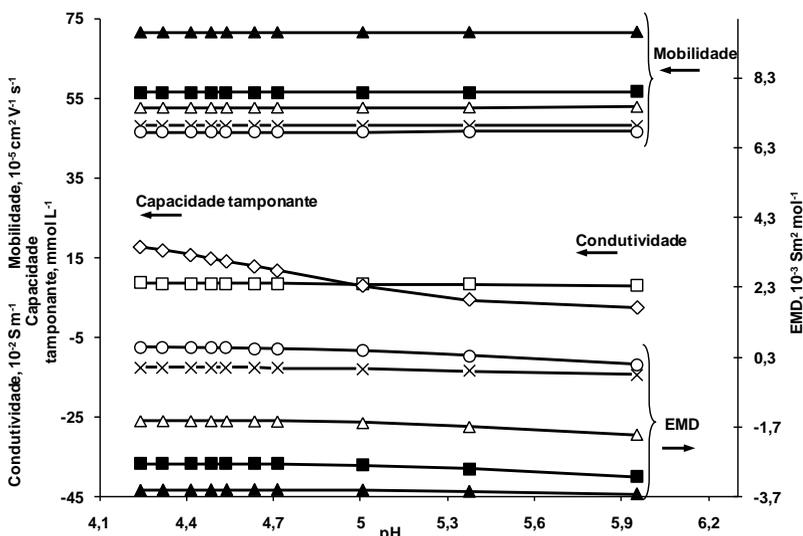


**Figura 6.** Curvas de mobilidade efetiva dos analitos.

Legenda: (▲ potássio; ■ bário; Δ cálcio; ○ magnésio; x sódio; ● imidazol);

As curvas de mobilidade dos analitos auxiliam na seleção do pH da separação, no modo de operação e os componentes do eletrólito [23, 26, 27]. De acordo com a Figura 6, o pH ideal de separação ocorre em valor inferior a 5,5, onde se observa diferenças nas mobilidades, além de constância nesta faixa. A atuação do imidazol abaixo deste pH é ideal pois encontra-se totalmente ionizado e com mobilidade constante e mais próxima aos analitos, no entanto, o imidazol não apresenta capacidade tamponante nesta faixa de pH e o contra-íon escolhido neste caso foi o ácido acético, a fim de que o eletrólito de corrida apresente capacidade tamponante.

O desenvolvimento do método foi iniciado através de simulação utilizando o “software” *Peakmaster*<sup>®</sup> [28 - 32] (Figura 7), avaliando o comportamento dos analitos quanto aos parâmetros de: mobilidade efetiva, dispersão por eletromigração (EMD), capacidade tamponante e condutividade. As variações do pH do eletrólito deram-se pelas combinações, de 10 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol mantido constante e ácido acético variando de 10 - 40 mmol L<sup>-1</sup>.



**Figura 7.** Avaliação dos parâmetros eletroforéticos utilizando o “software” *Peakmaster*<sup>®</sup>. Concentração de imidazol 10 mmol L<sup>-1</sup>, Ácido acético 10 - 40 mmol L<sup>-1</sup>. Legenda: mobilidade e EMD (▲ potássio; ■ bário; △ cálcio; x sódio; ○ magnésio); □ condutividade; ◇ capacidade tamponante. As setas indicam o eixo das ordenadas para cada parâmetro.

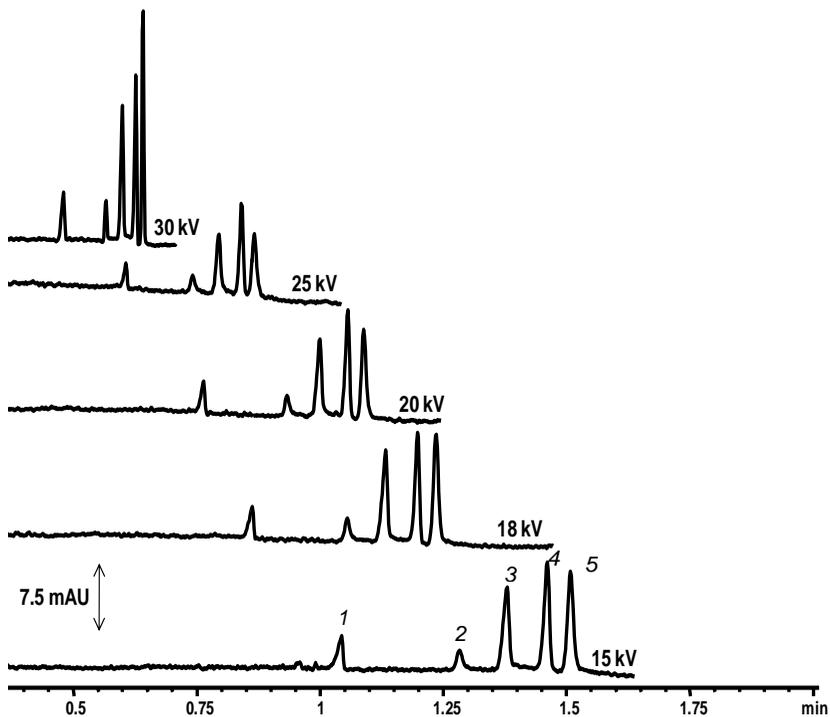
Para definição da composição ideal do eletrólito de corrida foi escolhida a concentração de imidazol e ácido acético em que as mobilidades dos analitos mostrem-se diferentes entre si, evitando a co-migração de picos.

A dispersão por eletromigração se deve a diferença de intensidade do campo elétrico entre a zona do analito e do eletrólito de corrida [33]. Idealmente a EMD deve ser próxima de zero, caracterizando picos simétricos. Para os analitos estudados, a EMD se mantém afastada de zero, no entanto constante. Tanto para as mobilidades como para a EMD a condição ideal pode ser encontrada em praticamente toda a faixa de pH estudado. A escolha do ácido acético como contra-íon do eletrólito de corrida deveu-se por este ácido apresentar boa capacidade tamponante ( $pK_a = 4,75$ ) na faixa de pH em estudo.

Uma capacidade tamponante elevada é apreciável em eletroforese capilar devido aos efeitos de eletrólise e às variações do fluxo eletrosmótico, frente às variações de pH. A condutividade do eletrólito manteve-se praticamente constante em toda faixa de pH.

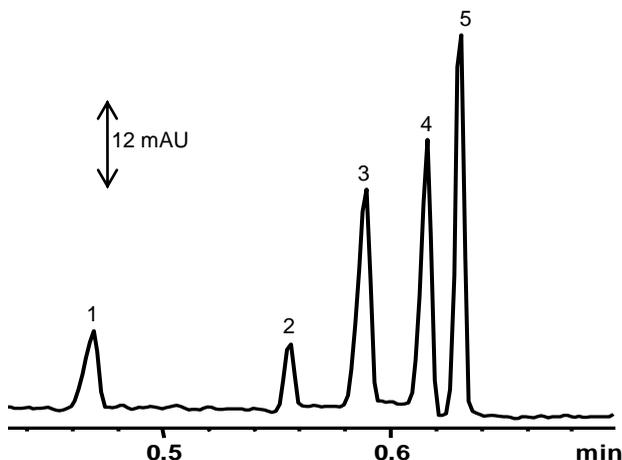
De acordo com as condições discutidas acima, a composição ideal do eletrólito de trabalho foi definido em  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de imidazol e  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido acético, privilegiando uma alta capacidade tampouante ( $17,7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em pH de 4,24.

O aumento da tensão aplicada na separação em eletroforese capilar diminui o tempo de análise, como mostra a Figura 8, melhorando a eficiência dos picos. Para tanto, foram avaliadas as tensões de 15 até 30 kV.



**Figura 8.** Efeito da tensão aplicada na separação dos analitos. Legenda: 1 – potássio; 2 – bário; 3 – cálcio; 4 – sódio; 5 – magnésio. Eletrólito composto por 10 mmol L<sup>-1</sup> imidazol, 40 mmol L<sup>-1</sup> ácido acético (pH 4,24). Condições: injeção hidrodinâmica (50 mbar, 5 s), tensão aplicada + 30 kV; 25 °C; detecção indireta em 214 nm.

A tensão definida para separação dos cátions foi de + 30 kV, onde se observa maior velocidade na separação em tempo inferior a 0,7 minutos, acompanhada de aumento na eficiência sem comprometimento na resolução dos picos. O perfil eletroforético de uma solução dos padrões pode ser observado na Figura 9.



**Figura 9.** Eletroferograma de mistura de padrões dos cátions em concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . Legenda: 1 – potássio; 2 – bário; 3 – cálcio; 4 – sódio; 5 – magnésio. Condições de análise ver Figura 8.

#### 4.2. Otimização da extração dos analitos das amostras

O planejamento fatorial fracionado foi utilizado a princípio para “screening”, ou seja, verificar quais são as variáveis dentro de uma faixa de níveis investigados que influenciarão significativamente na resposta. No presente caso, realizou-se um planejamento fracionário de dois níveis e cinco variáveis, com execução de 16 experimentos, ou seja,  $2^5$  de quinta ordem e triplicata do ponto central, cuja relação geradora é  $I=12345$ . Este tipo de fracionário é interessante, pois os efeitos principais estarão confundidos com interação de quarta ordem (pouco significativos) e as interações de segunda ordem não se confundem.

O tratamento dos dados pelo “software” *Design – Expert 7.1.6 Trial* para o planejamento mostrado na Tabela 3, gerou o modelo matemático mostrado na Equação 3.

$$\text{Fator resposta} = b_0 + b_1M + b_3\text{Ac} + b_4A + b_{12}M.V + b_{13}M.\text{Ac} + b_{14}M.A + b_{23}V.\text{Ac} + b_{24}V.A + b_{25}V.S + b_{34}\text{Ac}.A \quad (3)$$

Onde, o coeficiente  $b_0$  é o valor populacional da média de todas as respostas obtidas da combinação das variáveis mostradas na Tabela 3,  $b_1$ ,  $b_3$  e  $b_4$  são os coeficientes relacionados com as variáveis M (massa de biodiesel), Ac (ácido acético) e A (agitação) respectivamente. Os coefi-

coeficientes  $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{14}$ ,  $b_{23}$ ,  $b_{24}$ ,  $b_{25}$  e  $b_{34}$  são relacionados às interações MV, MAc, MA, VAc, VA, VS e AcA respectivamente. Os valores numéricos dos coeficientes são mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Coeficientes do modelo empírico.

<i>Coeficiente</i>	<i>Valor numérico</i>
$b_0$	$1,08 \pm 0,26$
$b_1$	$-0,57 \pm 0,13$
$b_3$	$-0,84 \pm 0,13$
$b_4$	$0,88 \pm 0,13$
$b_{12}$	$0,31 \pm 0,13$
$b_{13}$	$1,34 \pm 0,13$
$b_{14}$	$-0,98 \pm 0,13$
$b_{23}$	$0,42 \pm 0,13$
$b_{24}$	$-0,37 \pm 0,13$
$b_{25}$	$0,52 \pm 0,13$
$b_{34}$	$-0,79 \pm 0,13$

As interpretações descritas a seguir sobre a significância ou não das variáveis e seus efeitos foram baseadas em testes na forma da ANOVA [34], sendo tais observações firmadas com confiança de 95 %.

O sinal negativo para os coeficientes indicam que ao passarmos a variável do nível baixo (-1) ao alto (+1), há diminuição da resposta, já os coeficientes positivos indicam que ao passarmos do nível baixo ao alto ocorre aumento na resposta.

As variáveis, volume da fase extratora (V) e sonicação (S) respectivamente  $b_2$  e  $b_5$ , não apresentaram significância na extração, e assim foram fixadas no nível mais baixo. Os valores negativos dos coeficientes  $b_1$  e  $b_3$  que representam massa de biodiesel (M) e ácido acético (Ac) respectivamente, refletem que ao passarmos a variável do nível baixo ao alto observamos diminuição do valor dado pela equação empírica, e uma resposta alta é alcançada no nível inferior destas variáveis. Já a variável agitação (A) denotada por  $b_4$ , alcança maiores valores na resposta do modelo quando se encontra na condição mais alta. Em outras palavras, os resultados apontam que melhores resultados serão obti-

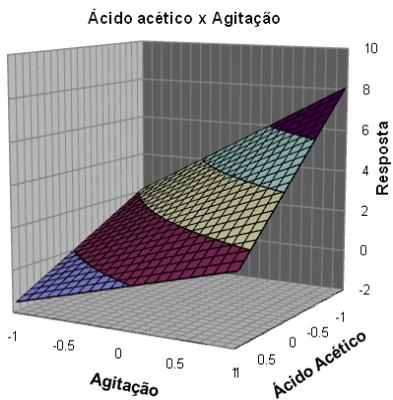
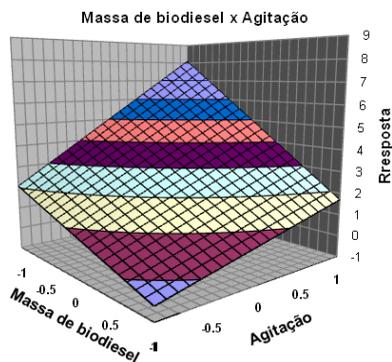
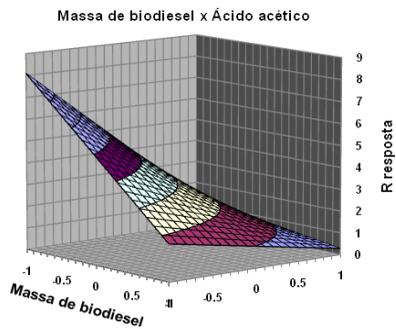
dos pela diminuição da massa de biodiesel e volume de fase extratora, porém com aumento do tempo de agitação.

Este resultado é bem coerente com a teoria sobre extração líquido-líquido, a qual pressupõe que o aumento da superfície de contato entre a amostra e o solvente pelo efeito da agitação, aumenta a eficiência da extração. As interações de segunda ordem  $b_{13}$ ,  $b_{14}$  e  $b_{34}$  corroboram com a mesma análise.

Para interpretação dos efeitos de interação de segunda ordem, observamos que os coeficientes que apresentam valores positivos denotam que ocorre aumento da resposta para o modelo quando ambas variáveis estão em nível baixo ou alto. Já para valores de coeficientes negativos, observa-se que o aumento da resposta é alcançado quando uma variável está em nível baixo e outra em alto. As interações de ordem 3, 4 e 5, via de regra não são relevantes, portanto, não compõem o modelo.

Estes resultados fecham o ciclo da triagem de variáveis, onde foram fixadas as variáveis sonicação e volume da fase extratora (200  $\mu\text{L}$ ) em seus níveis mais baixos.

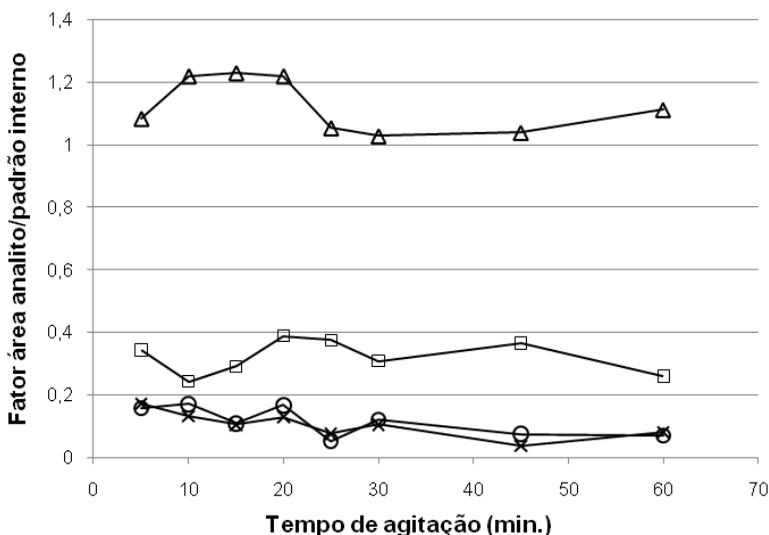
De acordo com a discussão acima e a observação gráfica das demais variáveis significativas ao processo (Figura 10) foi definida a condição ideal para extração dos cátions.



**Figura 10.** Correlação das variáveis: massa de biodiesel, ácido acético e agitação para definição da condição ideal de extração dos cátions.

Para construção dos gráficos mostrados na Figura 10, foram fixados no nível baixo (-1) as variáveis sonicação e volume da fase extratora. Como observado pelos coeficientes do modelo, a variável agitação foi fixada no nível alto (+1) por apresentar aumento da resposta. A observação dos gráficos mostra que o máximo da resposta dada pelo modelo é obtida quando as variáveis massa de biodiesel e ácido acético são fixadas nos níveis mais baixos (-1). Portanto, a condição definida como ideal para extração dos cátions metálicos da matriz biodiesel foi: massa de biodiesel de 200 mg, volume da fase extratora em 200  $\mu$ L e agitação em 20 minutos.

Como apenas a agitação foi considerada ideal quando em nível alto. Foi executada uma otimização univariada para avaliação da extração em tempos entre 5 – 60 minutos de agitação, mostrado na Figura 11, onde as outras variáveis foram fixadas em seus níveis ideais.



**Figura 11.** Otimização do tempo de agitação com relação ao fator área analito/padrão interno. Legenda: x – potássio, □ – cálcio, Δ - sódio e ○ – magnésio. Condições de análise ver Figura 8.

O estudo do tempo de agitação mostrou que as maiores áreas são de fato alcançadas em tempo de 20 minutos para todos os analitos, como previsto pelo modelo empírico. Através desta constatação, nada

foi modificado da condição ideal de extração dos analitos das amostras de biodiesel.

#### 4.3. Estudo da conformidade do sistema

O teste de adequação do método foi realizado pela média de oito medidas consecutivas de preparação da mistura dos padrões dos cátions e padrão interno em concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . Tal adequação foi expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD%) para tempo de migração e área do pico, como razão, com relação ao padrão interno. Foram determinados o número de pratos por metro (N/m) e resolução ( $R_s$ ) vistos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Adequação do método em desvio padrão relativo RSD (%).

<i>Analito</i>	<i>Razão tempo de Migração<sup>c</sup></i>	<i>Razão área do Pico<sup>c</sup></i>	<i>Número de pratos (N/m)<sup>c</sup></i>	<i>Resolução<sup>c</sup></i>
<b>K<sup>+</sup></b>	0,49	1,91	11 163	6,20 $R_{K,Ba}$
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	0,37	2,33	30 375	2,46 $R_{Ba,Ca}$
<b>Na<sup>+</sup></b>	0,42	1,96	24 305	1,72 $R_{Ca,Na}$
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	0,45	2,78	26 279	2,84 $R_{Na,Mg}$

<sup>c</sup> n = 8.

Os valores da razão área do pico mostraram desvio padrão relativo menores que 3 % e, para razão do tempo de migração inferiores a 1%. As resoluções mostraram valores superiores a 1,72 para os analitos, consideradas satisfatórias para determinação quantitativa, bem como boa eficiência com número de pratos superiores a 11 000. Assim, o método mostrou-se adequado para continuação do processo de validação.

##### 4.3.1. Figuras de mérito

As curvas de calibração externas foram construídas em onze níveis de concentração pela diluição da solução estoque de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  com padrão interno na concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . A faixa de calibração do método foi compreendida de  $0,5 - 20 \text{ mg L}^{-1}$ .

Na Tabela 7 são mostradas as figuras de mérito das curvas para os cátions realizadas em triplicata autêntica de preparação e injeção.

**Tabela 7.** Parâmetros das curvas.

<i>Analito</i>	$a^d$	$b^d$	$R^2$	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
<b>K<sup>+</sup></b>	0,3109 ± 0,0030	- 0,0065 ± 0,030	0,999	0,3	1,0
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	0,7510 ± 0,0062	0,0692 ± 0,0669	0,999	0,3	0,9
<b>Na<sup>+</sup></b>	0,7861 ± 0,0079	- 0,0164 ± 0,0759	0,999	0,3	1,0
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	1,0305 ± 0,0107	0,0530 ± 0,1000	0,999	0,3	1,0

<sup>d</sup>  $y = ax + b$ .

O método mostrou, dentro da faixa de aplicação, de 0,5 – 20 mg L<sup>-1</sup> valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,9991. Os limites de detecção e quantificação podem ser calculados de três maneiras diferentes, através do método visual, relação sinal-ruído e avaliação de parâmetros da curva de calibração [35]. A partir da equação da curva de regressão foram calculados os valores de LOD e LOQ, sendo respectivamente, 3,3 e 10 vezes o desvio padrão do intercepto pelo coeficiente angular da curva. Para os analitos o valor de LOD foi de 0,3 mg L<sup>-1</sup> e o maior valor de LOQ 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Para a aplicabilidade do método estes valores são adequados, tendo em vista o limite de concentrações de Na + K e Ca + Mg serem 5 mg kg<sup>-1</sup> [18].

A avaliação da precisão intra – ensaios foi determinada por vinte (n = 20) injeções consecutivas de uma mesma mistura padrão dos cátions e padrão interno em 5 mg L<sup>-1</sup>. A avaliação inter - ensaios foi realizada por seis (n = 6) injeções consecutivas em três diferentes dias, ambas as precisões são apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Precisão intra e inter - ensaios para os cátions.

<i>Analito</i>	<b>Intra – ensaio<sup>e</sup> (RSD%)</b>		<b>Inter – ensaio<sup>f</sup> (RSD%)</b>	
	<i>Razão tempo de migração</i>	<i>Razão área do pico</i>	<i>Razão tempo de migração</i>	<i>Razão área do pico</i>
<b>K<sup>+</sup></b>	0,18	1,33	0,62	4,57
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	0,09	1,88	0,20	6,88
<b>Na<sup>+</sup></b>	0,08	1,81	0,42	5,81
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	0,11	1,86	0,54	5,02

<sup>e</sup> (n= 20), <sup>f</sup> (n = 6).

Para medida da precisão intra – ensaio o desvio padrão relativo RSD (%) da razão área dos picos foram inferiores a 1,88 %, para tempo

de migração o RSD foi inferior a 0,18 %. Comparando estes resultados do desvio padrão intra – ensaio com os da Tabela 6, observamos uma melhora significativa nas medidas, dada pelo aumento do número de replicatas de  $n = 8$  para  $n = 20$ . Quanto à precisão inter – ensaio o desvio padrão relativo mostrou-se maior para razão área dos picos com valores inferiores a 6,88 % e para tempo de migração o RSD foi inferior a 0,62 %. Observamos que o desvio padrão inter – ensaio com relação à área dos analitos sofre maior influência com o passar do tempo, evidenciando a necessidade de realização de curva de calibração externa em cada dia de realização de análise.

O estudo da recuperação para determinação da exatidão do método foi realizado pela construção de curvas de calibração por adição de padrão.

Como primeira tentativa da adição de padrão, os analitos foram preparados em diferentes proporções em solução de etanol (98 %), para possibilitar a solubilização completa destes na amostra. No entanto, mesmo em proporções muito baixas de etanol, (30 %) na solução, os cátions precipitavam na forma de sais.

Devido ao fato de os padrões dos cátions não serem solúveis em solvente miscível na matriz biodiesel, a alternativa encontrada foi a de adicionar sobre as amostras, solução padrão aquosa em quatro níveis de concentração (1; 2; 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>) e posterior adição do padrão interno. Os resultados de recuperação são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Avaliação da recuperação cátions.

<i>Analito</i>	<i>Adicionado<sup>g</sup></i>	<i>Encontrado<sup>g</sup></i>	<i>Recuperação (%)</i>
<b>K<sup>+</sup></b>	0	< LOQ	-
	1,26	1,42	112,8 ± 7,1
	2,52	2,62	104,0 ± 10,8
	5,04	4,51	89,5 ± 0,5
	10,09	9,20	91,2 ± 2,4
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	0	< LOQ	-
	1,28	1,20	93,9 ± 10,6
	2,58	2,51	97,4 ± 1,0
	5,15	4,60	88,9 ± 1,3
	10,31	9,65	93,7 ± 5,0
<b>Na<sup>+</sup></b>	0	< LOQ	-
	1,25	1,63	113,4 ± 5,4
	2,51	2,73	109,0 ± 1,3
	5,02	4,42	88,1 ± 4,7
	10,03	9,69	96,7 ± 5,8
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	0	< LOQ	-
	1,26	1,55	123,0 ± 2,0
	2,52	2,80	103,4 ± 12,6
	5,22	4,74	90,8 ± 3,0
	10,08	10,09	100,1 ± 3,0

<sup>g</sup> Concentração em mg L<sup>-1</sup>.

As recuperações variaram em 89,5 – 112,8 % para potássio; 88,9 – 97,4 % para cálcio; 88,1 – 113,4 % para sódio e 90,8 – 123,0 % para magnésio. A avaliação da exatidão do método (Tabela 10) foi comparada com amostras também analisadas pelo método oficial EN 14538 (ICP - OES), recomendado pela ANP [18]. O método mostrou-se exato perdendo um pouco em precisão. No entanto, considerando o gasto mínimo de amostra e solventes para preparo desta, e principalmente a rapidez na determinação simultânea dos analitos quando comparado com outros métodos na literatura como ICP – OES [20, 21] e AAS [15] o método demonstrou apreciável exatidão.

**Tabela 10.** Comparação de resultados do método proposto e o oficial.

<i>Amostra</i>	<i>Analito<sup>h</sup></i>	<i>ICP – OES</i>	<i>CE</i>
<b>Biodiesel de fritura (A)</b>	Na <sup>+</sup>	2,00 ± 0,10	2,3 ± 0,8
<b>Biodiesel de fritura (8)</b>	K <sup>+</sup>	16,76	16,8 ± 1,5

<sup>h</sup>mg kg<sup>-1</sup>

Para avaliação da seletividade do método e da interferência da matriz são mostrados na Tabela 11 os coeficientes das curvas de regressão pelo método de adição de padrão realizados em duplicata de preparação.

**Tabela 11.** Coeficientes das curvas de regressão da adição de padrão.

<i>Analito</i>	<i>a<sup>ij</sup></i>	<i>b<sup>ij</sup></i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>Seletividade (%)</i>
<b>K<sup>+</sup></b>	0,2773 ± 0,0106	0,0860 ± 0,0537	0,998	89,3 ± 3,4
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	0,6983 ± 0,0428	0,3884 ± 0,1018	0,999	93,0 ± 5,7
<b>Na<sup>+</sup></b>	0,7457 ± 0,0475	1,9495 ± 0,1528	0,996	94,8 ± 6,0
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	1,0072 ± 0,0352	0,0699 ± 0,1741	0,995	97,7 ± 3,4

<sup>i</sup>y = ax + b; <sup>j</sup>n = 2

A seletividade relativa foi determinada comparando os coeficientes angulares das curvas construídas pelo método de adição de padrão preparadas em duplicata com relação às curvas pelo método de calibração externo (Tabela 7). As seletividades dadas em percentual foram de 89,3 % para potássio, 93,0 % para cálcio, 94,8 % para sódio e 97,7 % para magnésio. Os valores mostram que o método é seletivo para os analitos. Não foi observada pronunciada interferência da matriz biodiesel na extração.

#### 4.4. Análise de amostras

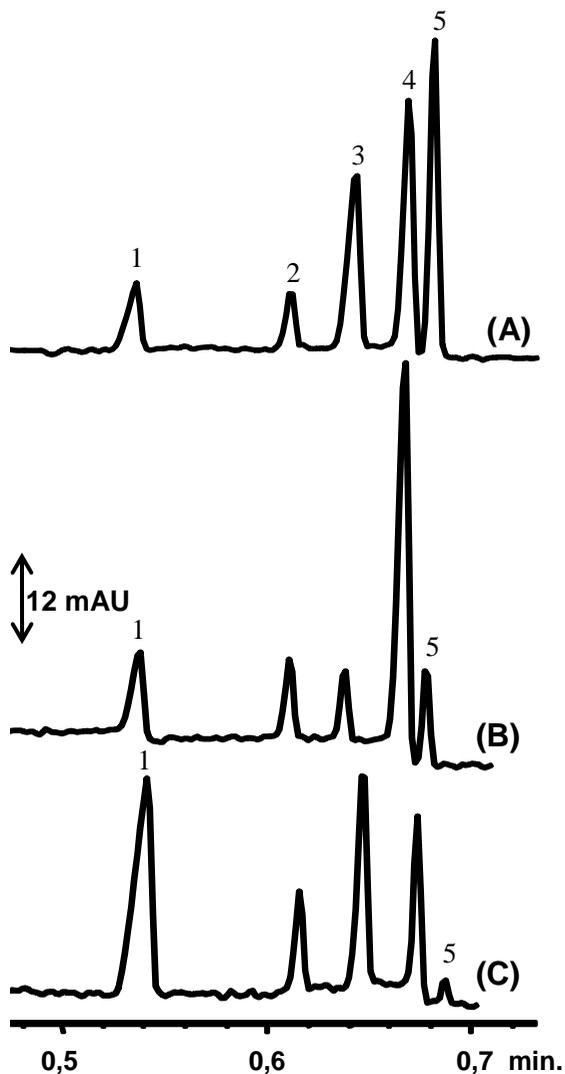
Análises de cátions inorgânicos das amostras de biodiesel e uma amostra de óleo de soja são apresentadas na Tabela 12. As amostras foram preparadas em duplicata e analisadas em triplicata.

Segundo parâmetros da ANP [18], apenas o biodiesel de soja (NT) teria resultados satisfatórios e, ser considerado um biodiesel de qualidade para comercialização do ponto de vista deste requisito de controle da qualidade. A amostra de biodiesel de mamona, apesar da quantidade de potássio detectada ter ficado abaixo do limite de detecção

do método ( $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), não seria recomendada a sua utilização pois pequenas quantidades de potássio não detectadas levariam este biodiesel à ultrapassar o limite permitido da soma de potássio e sódio. As demais amostras, mostraram valores superiores a  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  para (Na + K), sendo consideradas impróprias para uso comercial devido possivelmente ao processo ineficiente de lavagem do produto. A Figura 12, mostra os perfis eletroforéticos da mistura dos padrões e de duas amostras.

**Tabela 12.** Determinação dos cátions em amostras dado em  $\text{mg kg}^{-1}$ .

<i>Amostra</i>	$K^+$	$Na^+$	$Ca^{2+}$	$Mg^{2+}$
<b>Óleo de soja</b>	$1,1 \pm 0,1$	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>Biodiesel de soja</b>	< LOQ	$2,6 \pm 0,5$	< LOQ	< LOQ
<b>Biodiesel de soja</b>	< LOQ	$7,8 \pm 2,4$	< LOQ	< LOQ
<b>Biodiesel de mamona</b>	< LOQ	$4,5 \pm 0,1$	< LOQ	< LOQ
<b>Biodiesel de fritura</b>	$16,8 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,8$	$3,4 \pm 0,3$	< LOQ
<b>Biodiesel de fritura</b>	$6,7 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$	< LOQ	< LOQ
<b>Biodiesel de fritura</b>	$11,8 \pm 0,4$	$39,6 \pm 0,7$	< LOQ	< LOQ
<b>Biodiesel de fritura</b>	$16,8 \pm 1,5$	$28,7 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,3$	< LOQ



**Figura 12.** Eletroferograma dos cátions estudados. Legenda: 1 – potássio; 2 – bário; 3 – cálcio; 4 – sódio; 5 – magnésio. (A) mistura de padrões 5 mg L<sup>-1</sup>; (B) biodiesel de soja e (C) biodiesel de óleo de fritura. Eletrólito composto por 10 mmol L<sup>-1</sup> imidazol, 40 mmol L<sup>-1</sup> ácido acético (pH 4,24). Condições: injeção hidrodinâmica (50 mbar, 5 s), tensão aplicada + 30 kV; 25 °C; detecção indireta em 214 nm.

## 5. CONCLUSÕES

A utilização de planejamentos experimentais do tipo fracionário com ponto central, aceleram o processo de otimização pela triagem de variáveis significativas, além de avaliar com maior critério as interações entre elas no processo de extração dos analitos das amostras.

A eletroforese capilar mostrou seu grande potencial no desenvolvimento de um método analítico rápido, com apreciável exatidão e de baixo consumo de amostras, reagentes e livre de solventes tóxicos, associado a um simples procedimento para preparo de amostra.

O método proposto mostrou - se satisfatório quanto aos parâmetros de precisão intra e inter – ensaios, linearidade, seletividade e recuperação, demonstrando seu potencial de aplicabilidade na determinação rápida de sódio, potássio, cálcio e magnésio em biodiesel.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. *J. Am. Oil Chem*, v. 63, p. 1375, 1986.
- [2] FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng*, v. 92, p. 405–16, 2001.
- [3] SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel*, v. 87, p. 2355–2373, 2008.
- [4] GRYGLEWICZ, S. Rapeseed oil methyl esters preparation using heterogeneous catalysts. *Bioresource Technology*, v. 70, p. 249 – 253, 1999.
- [5] DOSSIN, T. F.; REYNIERS, M. F.; BERGER, R. J.; MARIN, G. B. Simulation of heterogeneously MgO-catalyzed transesterification for fine-chemical and biodiesel industrial production. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 67, p. 136–48, 2006.
- [6] ZABETI, M.; DAUD, W. M. A. W.; AROUA, M. K. Activity of solid catalysts for biodiesel production: A review. *Fuel Processing Technology*, v. 90, p. 770–777, 2009.
- [7] ABREU, F. R.; LIMA, D. G.; HAMÚ, E. H.; EINLOFT, S.; RUBIM, J. C.; SUAREZ, P. A. Z. New metal catalysts for soybean oil transesterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 80, p. 601–604, 2003.
- [8] GRANADOS, M. L.; POVES, M. D. Z.; ALONSO, D. M.; MARISCAL, R.; GALISTEO, F. C.; MORENO-TOST, R.; SANTAMARÍA, J.; FIERRO, J. L. G. Biodiesel from sunflower oil by using activated calcium oxide. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 73, p. 317–326, 2007.
- [9] LIU, X.; PIAO, X.; WANG, Y.; ZHU, S.; HE, H. Calcium methoxide as a solid base catalyst for the transesterification of soybean oil to biodiesel with methanol. *Fuel*, v. 87, p.1076–1082, 2008.

- [10] WANG, L.; YANG, J. Transesterification of soybean oil with nano-MgO or not insupercritical and subcritical methanol. *Fuel*, v.86, p. 328–333, 2007.
- [11] JITPUTTI, J.; KITIYANAN B.; RANGSUNVIGIT, P.; BUNYAKIAT, K.; ATTANATHO, L.; JENVANITPANJAKUL, P. Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalysts. *Chemical Engineering Journal*, v. 116, p. 61–66, 2006.
- [12] XIE, W.; HUANG, X. Synthesis of biodiesel from soybean oil using heterogeneous KF/ZnO catalyst. *Catalysis Letters*, v. 107, p. 53–59, 2006.
- [13] 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*, v. 88, p. 764–766, 2009.
- [14] CASTILHO, M. S.; STRADIOTTO, N. R. Determination of potassium ions in biodiesel using a nickel(II) hexacyanoferrate-modified electrode. *Talanta*, v. 74, p. 1630–1634, 2008.
- [15] DE JESUS, A.; SILVA, M. M. E.; VALE, M. G. R. The use of microemulsion for determination of sodium and potassium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 74, p. 1378 – 1364, 2008.
- [16] MONTEIRO, M. R.; AMBROZIN, A. R. P.; LIÃO, L. M.; FERREIRA, A. G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta*, v. 77, p. 593–605, 2008.
- [17] REI, P. A. G.V. **Procedimentos laboratoriais para o controlo da qualidade do biodiesel**. 2007. 142 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2007.
- [18] ANP - Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução nº 7 de 19 de março de 2008. *Regulamento Técnico*, n. 207/ 2008. Brasília: Diário Oficial da União.

- [19] KORN, M. G. A.; DOS SANTOS, D. S. S.; WELZ, B.; VALE, M. G. R.; TEIXEIRA, A. P.; LIMA D. C.; FERREIRA, S. L. C. Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels – A review. *Talanta*, v. 73, p. 1 – 11, 2007.
- [20] EDLUND, M.; VISSER, H.; HEITLAND, P. Analysis of biodiesel by argon–oxygen mixed-gas inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 17, p. 232 – 235, 2002.
- [21] DOS 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. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 22, p. 1300–1303, 2007.
- [22] CHAVES, E. S.; SAINT'PIERRE, D.; DOS SANTOS, E. J.; TORMEN, L.; BASCUÑAN, V. L. A. F.; CURTIUS, A. J. Determination of Na and K in biodiesel by flame atomic emission spectrometry and microemulsion sample preparation. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 19, p. 856 – 861, 2008.
- [23] GONÇALVES FILHO L. C., MICKE, G. A. Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis. *J. of Chromatogr. A*, v. 1154, p. 477-480, 2007.
- [24] HIROKAWA, T. NISHINO, M.; AOKI, N.; KISO, Y.; SAWAMOTO, Y.; YAGI, T.; AKIYAMA, J. *J. Chromatogr.* v. 271 D1, 1983.
- [25] ITO, K.; HIROKAWA, T. Separation of alkali and alkaline-earth metal and ammonium cations by capillary electrophoresis using poly(ethylene glycol) and tartaric acid. *J. Chromatogr. A*, v. 742, p. 281-288, 1996.
- [26] COSTA, A. C. O.; DA COSTA, J. L.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M.; MICKE, G. A. Development of a fast capillary electrophore-

sis method for determination of creatinine in urine samples. *J. Chromatogr. A*, v. 1171, p. 140 – 143, 2007.

[27] COSTA, A. C. O.; PERFEITO, L. S.; TAVARES, M. F. M.; MICKE, G. A. Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis - Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. *J. Chromatogr. A*, v. 1204, p. 123–127, 2008.

[28] JOHNS, C.; BREADMORE, M. C.; MACKA, M.; RYVOLOVÁ, M.; HADDAD, P. R. Recent significant developments in detection and method development for the determination of inorganic ions by CE. *Electrophoresis*, v. 30, p. S53–S67, 2009.

[29] GAŠ, B.; COUFAL, P. JAROŠ, M.; MUZIKÁŘ, J.; JELÍNEK, I. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: I. Mathematical and computational model. *J. Chromatogr. A*, v. 905, p. 269 – 279, 2001.

[30] ŠTĚDRÝ, M.; JAROŠ, M.; GAŠ, B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes. *J. Chromatogr. A*, v. 960, p. 187 – 198, 2002.

[31] ŠTĚDRÝ, M.; JAROŠ, M.; VČELÁKOVÁ, K.; GAŠ, B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes. *Electrophoresis*, v. 24, p. 536 – 547, 2003.

[32] ŠTĚDRÝ, M.; JAROŠ, M.; HRUŠKA, V.; GAŠ, B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: III. Linear theory of electromigration. *Electrophoresis*, v. 25, p. 3071 – 3079, 2004.

[33] ERNY, G. L.; BERGSTROM, E. T.; GOODALL, D. M.; GRIEB, S. Predicting peak shape in capillary zone electrophoresis: a generic approach to parametrizing peaks using the Haarhoff-Van der Linde (HVL) function. *Analytical chemistry*, v. 73, p. 4862- 4872, 2001.

[34] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculo de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quím. Nova*, v. 29, n. 2, p. 338 – 350, 2006.

[35] United States Pharmacopeia Convention, US Pharmacopeia 24, Validation of Compendial Methods 1225, Rockville, 1999.

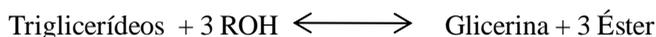
## Capítulo 3

### Desenvolvimento de metodologia para determinação de $\alpha$ - monoglicerídeos em biodiesel

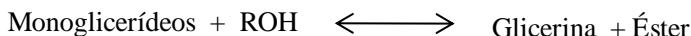
#### 1. INTRODUÇÃO

A síntese de biodiesel consiste basicamente de três etapas consecutivas, onde os triglicerídeos (matéria – prima) na presença de álcool e catalisador são transformados em diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerina, sendo que em cada etapa são formados um mol de éster de ácido graxo (biodiesel) [1]. As etapas de síntese do biodiesel podem ser esquematizadas da seguinte forma:

*Reação global de síntese:*



*As etapas intermediárias da reação são:*



O produto final pode conter quantidades significativas de contaminantes como glicerina, monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos oriundos da transesterificação incompleta e, ou purificação inadequada [2].

Um dos principais parâmetros para atestar a qualidade de biodiesel é o conteúdo de glicerídeos presentes [3,4].

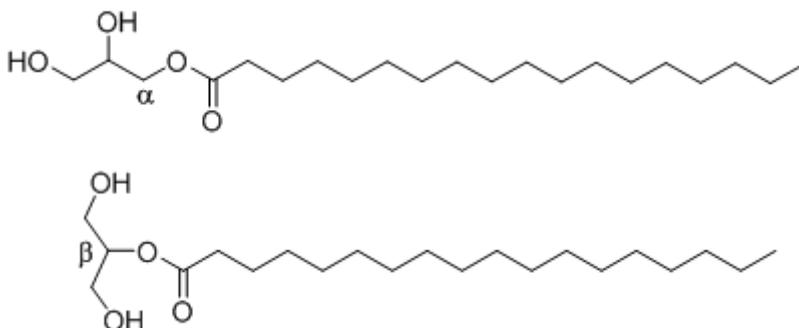
Segundo Schumacher e Elser, testes em motores diesel mostraram que em longo prazo o maior conteúdo de glicerídeos, como a transesterificação em grau abaixo de 95%, pode causar a formação de depósitos no bocal de injeção, no pistão e nas válvulas, assim como altos níveis de glicerídeos podem causar cristalização e aumento da viscosidade do combustível [5].

A norma brasileira ANP, Resolução nº 7 de 19 de março de 2008 [6], orienta as análises de glicerídeos (mono-, di- e triglicerídeos) de acordo com as normas da "American Society for Testing and Materials" (ASTM D6751) e do "Comité Européen de Normalisation" (EN 14105). Ambas metodologias são baseadas na medida do teor destes glicerídeos por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC – FID). Apenas a norma Européia estabelece limites máximos de 0,8 % (m/m) de monoglicerídeos, 0,4 % (m/m) para diglicerídeos e 0,4 % (m/m) para triglicerídeos [7].

Muitos métodos foram desenvolvidos para medir o teor de glicerídeos em biodiesel, destacando-se a cromatografia gasosa com detector de FID, utilizando diferentes agentes derivatizantes como N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) [8], mistura de (BSTFA) e N-Metil-N-trifluoroacetamida (MSTFA) em diferentes condições [2]. Cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (GC – MS) foi utilizada por Plank, e Lorbeer [9]. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi aplicada para estudos de glicerídeos em biodiesel utilizando uma vasta gama de detectores, como HPLC – UV, - ELSD, - MS [10, 11].

Na literatura encontram - se ainda a utilização de outras técnicas analíticas como: cromatografia de permeação em gel (GPC) [12] e Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) [12,13].

Os monoglicerídeos podem apresentar - se no biodiesel em duas formas:  $\alpha$  e  $\beta$  – monoglicerídeos (Figura 13). O conhecimento das quantidades desses compostos podem auxiliar o estudo mecanístico das reações de transesterificação de biodiesel.



**Figura 13.** Representação de  $\alpha$  e  $\beta$  - monoestearina (C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>).

Mais precisamente, a determinação de monoglicérides é baseada na oxidação quantitativa dos  $\alpha$  - monoglicérides com um excesso de ácido periódico. O iodato formado reage com iodeto que é adicionado, o triiodeto formado é titulado com solução de tiosulfato de sódio [14].

Este método é reproduzível e relativamente preciso, mas apresenta algumas desvantagens: (i) é extremamente laborioso, (ii) a glicerina pode interferir na reação se não for previamente extraída, (iii) o método determina apenas os  $\alpha$  - monoglicérides por apresentarem hidroxilas vicinais (Figura 13) e (iv) exige grandes quantidades de solventes tóxicos [15].

Outros métodos de análise de monoglicérides relatados na literatura são baseados nas técnicas de TLC [16], LC [17,18], e GC [18]. A cromatografia em fase gasosa continua a ser o método de escolha para a análise de metil ésteres de ácidos graxos (FAMES), mas não é realmente adequado para a separação de mono e diglicérides [15].

Na literatura pesquisada não foram encontrados trabalhos realizados para quantificação de  $\alpha$  - monoglicérides em biodiesel e matéria - prima utilizando a técnica de eletroforese capilar.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Desenvolver uma metodologia para determinação de  $\alpha$  - monoglicérides em biodiesel utilizando eletroforese capilar.

### 2.2. Específicos

Adaptar o método oficial para determinação de  $\alpha$  - monoglicérides em óleo vegetal para eletroforese;

Adequar o método de eletroforese capilar de determinação de glicerina livre para determinar o teor de  $\alpha$  - monoglicérides em biodiesel;

Avaliar a necessidade de formação de uma fase homogênea entre biodiesel e íons periodato para determinação dos  $\alpha$  - monoglicérides em biodiesel, através da construção de gráficos ternários de superfície;

Utilizar medidas espectrofotométricas no UV-Vis para determinação da turbidez da mistura ternária de água/clorofórmio/etanol;

Estudar o tempo reacional de íons periodato com  $\alpha$  - monoglicérides presentes em amostras de biodiesel de soja e óleo de soja em soluções contendo água/clorofórmio/etanol;

Aplicar o método analítico em determinações quantitativas de  $\alpha$  - monoglicérides em amostras de biodiesel de soja e óleo de soja.

### 3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

#### 3.1. Reagentes e Amostras

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, periodato de sódio e nitrato de sódio (Vetec, São Paulo, Brasil), glicina e hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha), ácido trifluoroacético – TFA (Fluka, Neu – Ulm, Alemanha), etanol, clorofórmio, ácido acético e glicerina (Synth, São Paulo, Brasil). Água desionizada (Milli - Q, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) foi utilizada para preparo das soluções. Soluções aquosas estoque ( $24,0 \text{ g L}^{-1}$ ) de periodato de sódio, ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) de nitrato de sódio e ( $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) de glicerina, foram estocadas sobre refrigeração à  $4^\circ\text{C}$ .

Uma mistura de monoglicerídeos grau técnico DIMODAM<sup>®</sup> PH 200 VEG foi gentilmente cedido pela empresa DANISCO (São Paulo, Brasil), esta é uma mistura de  $\alpha$  e  $\beta$  – monoglicerídeos e apresenta teor de monoglicerídeos acima de 90 % (Anexo 1).

As amostras de biodiesel de soja e óleo de soja (matéria – prima) foram adquiridas de empresas locais e de laboratórios desta Universidade.

#### 3.2. Equipamentos

Os procedimentos analíticos foram desenvolvidos no equipamento de eletroforese capilar da marca Agilent Technologies modelo HP <sup>3D</sup>CE (Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD). As análises foram efetuadas a  $25^\circ\text{C}$  em capilar de sílica fundida revestida externamente com poliimida ( $32,5 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m D.I.} \times 375 \mu\text{m D.E.}$ ) da marca Polymicro Technologies (Phoenix, USA).

As medidas de turbidez foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis modelo XI (FEMTO, São Paulo, Brasil) composto de lâmpadas de tungstênio e deutério, em sistema de simples feixe.

#### 3.3. Condição experimental

O primeiro condicionamento do capilar foi realizado a  $25^\circ\text{C}$  passando-se solução de NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) por 30 minutos, seguido de lavagem com água deionizada por 30 minutos, por fim, 20 minutos com o eletrólito de corrida utilizado para a análise. O condicionamento do capilar entre as análises foi de 0,6 minutos a pressão de 50 mbar com eletrólito de corrida. A injeção das soluções padrão e amostras foram

realizadas pelo “outlet” (extremidade do capilar mais próxima do detector), injeção hidrodinâmica a pressão de 50 mbar por 5 segundos. A separação dos analitos foi transcorrida em tensão aplicada de 30 kV, com polaridade negativa, em tempo inferior a 0,6 minutos. A detecção no UV foi efetuada de forma direta em 210 nm. Os dados foram então adquiridos e tratados pelo “software” *HP Chemstation*.

### 3.4. *Preparação da amostra*

#### 3.4.1. *Aplicada na avaliação preliminar*

Foram pesados aproximadamente 1,0 g de biodiesel em frasco com tampa de 15,0 mL, adicionou-se 1,0 mL de clorofórmio e sobre ambos, 10 mL de solução preparada pela mistura de periodato e sódio  $900 \text{ mg L}^{-1}$  e nitrato de sódio  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . A mistura foi mantida sob agitação constante com barra magnética por 30 min., seguida de centrifugado por 5 minutos em 2000 rpm. Foram transferidos 250  $\mu\text{L}$  da fase aquosa para um frasco e analisados por eletroforese capilar.

#### 3.4.2. *Aplicada no método final*

Foram pesados em balança analítica, aproximadamente 200 mg de amostra em um tubo de 15 mL com tampa. Adicionou-se 400  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e 800  $\mu\text{L}$  de água, o tubo foi fechado e vigorosamente agitado por 10 minutos seguido de centrifugação por 15 minutos em 2000 rpm. A fase aquosa (contendo glicerina livre) foi desprezada. Sobre a fase orgânica foram adicionados 1200  $\mu\text{L}$  de etanol e 200  $\mu\text{L}$  da mistura ( $9800 \text{ mg L}^{-1}$ ) de periodato de sódio e ( $400 \text{ mg L}^{-1}$ ) de nitrato de sódio. O tubo foi fechado e mantido sob agitação por 30 minutos na ausência de luz. Posteriormente foi adicionado 1200  $\mu\text{L}$  de água desionizada, seguido de agitação vigorosa e centrifugação por 5 minutos em 2000 rpm. Após a centrifugação foram transferidos 500  $\mu\text{L}$  da fase aquosa para um frasco e analisados por eletroforese capilar.

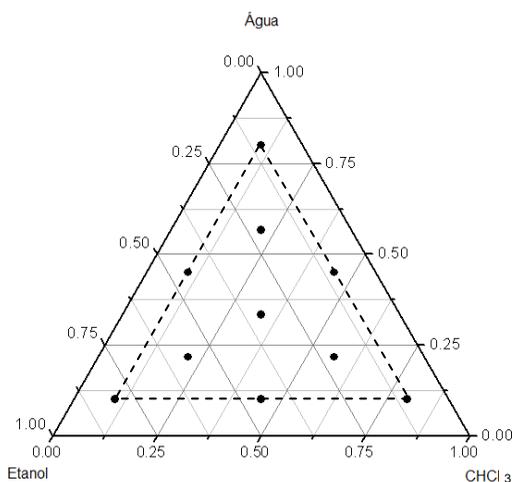
### 3.5. *Superfície de resposta ternária para otimização da determinação de $\alpha$ - monoglicérides*

Foi avaliada a necessidade da formação de uma única fase composta de: biodiesel, água, etanol e clorofórmio. Para tanto, um estudo experimental utilizando o “software” *Design Expert 7.1.6. Trial* foi aplicado variando as proporções destes componentes para uma mistura

ternária de acordo com a Tabela 13, onde são indicadas a quantidade de partes de cada solvente. Na Figura 14 é mostrado o espaço experimental.

**Tabela 13.** Planejamento experimental, partes de cada solvente.

<i>Experimento</i>	<i>Água</i>	<i>Etanol</i>	<i>Clorofórmio</i>
<b>1</b>	1	4	4
<b>2</b>	1	1	7
<b>3</b>	1	7	1
<b>4</b>	2	5	2
<b>5</b>	7	1	1
<b>6</b>	5	2	2
<b>7</b>	4	1	4
<b>8</b>	1	7	1
<b>9</b>	7	1	1
<b>10</b>	3	3	3
<b>11</b>	2	2	5
<b>12</b>	4	4	1
<b>13</b>	4	4	1
<b>14</b>	1	1	7



**Figura 14.** Espaço experimental da mistura ternária delimitado pela linha pontilhada.

A quantidade mínima de cada solvente foi fixada em 1 parte, tendo em vista a não solubilização de periodato em biodiesel, portanto a necessidade de água. Como o biodiesel não é solúvel em água e para que no mínimo ocorra a separação das fases após reação com periodato se faz necessário 1 parte de clorofórmio. Por fim, para que 1 parte de solução aquosa de periodato de sódio ( $24,0 \text{ g L}^{-1}$  concentração considerando máximo de 3% de monoglicérides em biodiesel) e biodiesel/clorofórmio formem uma única fase, o mínimo de 1 parte de etanol se faz necessária. A quantidade de biodiesel foi mantida constante em 1 parte em todos os experimentos.

Foram pesados em frascos de 15 mL com tampa aproximadamente 500 mg de biodiesel, seguido de adição de 500  $\mu\text{L}$  da solução de periodato de sódio ( $24,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e as parte de água, etanol e clorofórmio para volume final de 5 mL de acordo com a Tabela 14. Biodiesel mantido constante em 1 parte em todos os experimentos.

**Tabela 14.** Composição das misturas para determinação da turbidez e teor de iodato.

<i>Experimento</i>	<i>Água</i>	<i>Etanol</i>	<i>Clorofórmio</i>	<i>Solução <math>\text{NaIO}_4</math></i>
<b>1</b>	0	4	4	1
<b>2</b>	0	1	7	1
<b>3</b>	0	7	1	1
<b>4</b>	1	5	2	1
<b>5</b>	6	1	1	1
<b>6</b>	4	2	2	1
<b>7</b>	3	1	4	1
<b>8</b>	0	7	1	1
<b>9</b>	6	1	1	1
<b>10</b>	2	3	3	1
<b>11</b>	1	2	5	1
<b>12</b>	3	4	1	1
<b>13</b>	3	4	1	1
<b>14</b>	0	1	7	1

As soluções foram agitadas vigorosamente por 5 minutos e deixadas em repouso no escuro por 30 minutos para evitar a degradação dos íons periodato pela ação da luz [14] para completa reação entre periodato e os  $\alpha$  - monoglicérides.

A determinação da turbidez por leitura espectrofotométrica foi conduzida na região do UV-Vis em comprimento de onda de 600 nm [19, 20] em cubetas de quartzo. As misturas foram agitadas suavemente por 5 minutos seguida de 2 segundos em banho de ultra-som para eliminação bolhas de ar [21] e posterior leitura espectrofotométrica. Após as leituras, as soluções foram vertidas para frasco com tampa e adicionado 5 mL de água desionizada, seguido de agitação por 5 minutos e centrifugação em 4000 rpm por 10 minutos para separação das fases e 600  $\mu\text{L}$  da fase aquosa transferidos para frasco para determinação do teor de iodato formado por eletroforese capilar utilizando o método aplicado para glicerina livre [22].

### *3.6. Curva de calibração de glicerina na presença da mistura ternária etanol/clorofórmio/água*

Em um tubo de 15 mL com tampa foram adicionados volumes de 120  $\mu\text{L}$  de soluções etanólicas padrão de glicerina (2000 mg  $\text{L}^{-1}$ ) ou diluições desta, o volume foi completado até 1200  $\mu\text{L}$  com etanol. Posteriormente adicionado 400  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e 200  $\mu\text{L}$  da mistura (9800 mg  $\text{L}^{-1}$ ) de periodato de sódio e (400 mg  $\text{L}^{-1}$ ) de nitrato de sódio. O tubo foi fechado e mantido sob agitação por 30 minutos na ausência de luz. Posteriormente foi adicionado 1200  $\mu\text{L}$  de água desionizada, seguido de agitação vigorosa e centrifugação por 5 minutos em 2000 rpm. Após a centrifugação foram transferidos 500  $\mu\text{L}$  da fase aquosa para um frasco e analisados por eletroforese capilar.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos descritos daqui por diante para o desenvolvimento de um método analítico por eletroforese capilar dos  $\alpha$  – monoglicerídeos foi baseada em trabalhos de Gonçalves Filho e Micke. [22, 23] como continuação à implementação de métodos alternativos no controle de parâmetros químicos de biodiesel.

##### 4.1. Determinação de glicerina livre e total

Primeiramente foram realizadas melhorias no método de determinação de glicerina livre e total por eletroforese capilar com o intuito de adequar a faixa linear do método. As alterações do método constam na Tabela 15.

**Tabela 15.** Parâmetros da curva analítica para glicerina.

Parâmetros da curva <sup>a</sup>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
	0,0227 ± 0,0015	0,0459 ± 0,0174	0,9994 ± 0,0002
	<i>Alterações propostas<sup>a</sup></i>		<i>Método da literatura [22]</i>
<b>Faixa Linear</b> (mg L <sup>-1</sup> )	1,57 – 157		12 – 82
<b>LOD</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	0,16 ± 0,04		4,3 ± 0,8
<b>LOQ</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	6,28 ± 0,20		14,3 ± 1,0

<sup>a</sup> (n = 7) curvas em diferentes dias e injetadas em duplicata.

A modificação do método mostrou-se bastante satisfatória quanto ao aumento da faixa linear, bem como a diminuição dos limites de detecção e quantificação mantendo um bom coeficiente de determinação. Tais mudanças demonstram a versatilidade do método frente à necessidade de adequá-lo para análises de rotina.

Posterior às modificações do método estudos quantitativos aplicando o método foi desenvolvido no estudo de síntese de biodiesel a partir do óleo da leguminosa *Pachyrhizus erosus* (L.) Urb. O estudo detalhado encontra-se no Apêndice 1.

#### 4.2. Estudos preliminares para determinação dos $\alpha$ – monoglicerídeos

Este tópico versará sobre as inúmeras tentativas de se determinar os  $\alpha$  – monoglicerídeos sem a necessidade de maiores alterações no método ou de preparação laboriosa das amostras.

Foram realizadas medidas quantitativas de acordo com procedimento descrito no *item 3.4.1* para amostra de biodiesel e da mistura comercial de  $\alpha$  e  $\beta$  - monoglicerídeos. Na Tabela 16 são mostrados os valores das quantificações.

**Tabela 16.** Deteminação de  $\alpha$  - monoglicerídeos em amostras.

<i>Amostra</i> <sup>a</sup>	<i><math>\alpha</math>–monoglicerídeos (% m/m)</i> <sup>b</sup>	<i>RSD %</i>
<b>Biodiesel de Soja</b>	0,024 $\pm$ 0,012	35,1
<b>Mistura comercial de <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> - monoglicerídeos</b>	71,53 $\pm$ 33,20	46,4

<sup>a</sup> n = 3 <sup>b</sup> Expresso em massa de monoestearina (358,56 g mol<sup>-1</sup>) por massa de amostra.

A concentração de monoglicerídeos totais para a mistura comercial de  $\alpha$ ,  $\beta$  - monoglicerídeos foi avaliada através da determinação via metodologia de glicerina total [22], apresentando resultado de 93,0  $\pm$  0,3 %.

As quantificações mostraram a dificuldade em obter resultados precisos para ambos os tipos de amostra, evidenciados pelos altos valores de desvio padrão relativo. Na busca de resultados mais precisos a metodologia titulométrica para determinação dos  $\alpha$  - monoglicerídeos da “American Oil Chemists' Society” - AOCS [14] trata a preparação da solução de periodato como uma mistura de água e ácido acético.

##### 4.2.2. Adição de ácido acético à mistura reacional

Foram construídas curvas de calibração com a solução de periodato de sódio na relação H<sub>2</sub>O/HAc (1:9 v/v). Os resultados das curvas de calibração são apresentados na (Tabela 17), utilizando glicerina como padrão.

**Tabela 17.** Dados das curvas de calibração em diferentes composições do solvente da solução de periodato de sódio.

		<i>Parâmetros</i> <sup>a</sup>		
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
<b>Solução de NaIO<sub>4</sub></b>	H <sub>2</sub> O <sup>b</sup>	0,0227 ± 0,0015	0,0459 ± 0,0174	0,9994 ± 0,0002
	H <sub>2</sub> O/HAc (1:9 v/v) <sup>c</sup>	0,0185 ± 0,0016	0,0086 ± 0,0407	0,9978 ± 0,0027
<i>F</i> <sub>cal</sub>	<i>F</i> <sub>2,7</sub>	1,14	5,47	
<i>F</i> <sub>crit</sub>	<i>F</i> <sub>2,7</sub>	6,54		

<sup>a</sup>  $y = ax + b$ ; <sup>b</sup> (n = 8); <sup>c</sup> (n = 3).

De acordo com o teste *F* realizado para avaliação das curvas nas diferentes condições de preparação da solução de periodato, estas não apresentam diferença significativa no limite de 95% de confiança. Como os valores teste *F* calculado (*F*<sub>cal</sub>) para ambos coeficientes mostraram - se menores que os valores de *F*<sub>crit</sub>, não podemos descartar a hipótese nula, sendo assim, ambas as curvas fornecem resultados quantitativos sem diferença significativa com 95 % de confiança. Posteriormente foram realizadas quantificações de amostras utilizando ambas as curvas e os resultados mostraram desvio padrão relativo da medida maior que 16 % quando comparadas as curvas de periodato somente em água e com a presença de ácido acético. Os resultados mostrados na Tabela 18 foram obtidos pela curva construída com solução de periodato de sódio com ácido acético (1:9 v/v).

**Tabela 18.** Quantificações usando solução de periodato de sódio em H<sub>2</sub>O/HAc (1:9 v/v).

<i>Amostra</i>	<i>α</i> -monoglicérideos (% m/m) <sup>a</sup>
<b>Biodiesel de mamona</b>	0,666 ± 0,002
<b>Biodiesel de óleo de fritura</b>	0,972 ± 0,653
<b>Biodiesel de gordura de Ave</b>	0,536 ± 0,046
<b>Biodiesel Soja</b>	0,055 ± 0,013
<b>Mistura comercial de α, β – monoglicérideos</b>	42,84 ± 2,33

<sup>a</sup> Expresso em massa de monoestearina (358,56 g mol<sup>-1</sup>) por massa de amostra.

Observou - se melhora significativa na determinação visto pela diminuição do desvio padrão na determinação da mistura comercial de  $\alpha$ ,  $\beta$  - monoglicérides, comparando o resultado de  $71,53 \pm 33,20$  % (Tabela 16) com o método adaptado  $42,8 \pm 2,33$  %, bem como para o biodiesel de soja de  $0,024 \pm 0,012$  % (Tabela 3) para  $0,055 \pm 0,013$  %.

Uma hipótese para a melhora da precisão pode estar ligada ao aumento da miscibilidade do biodiesel e da solução aquosa de periodato pela presença de ácido acético, aumentando o contato entre as duas espécies reagentes.

Partindo do pressuposto de que o aumento da homogeneidade da mistura biodiesel e periodato interfere na determinação dos  $\alpha$  - monoglicérides, foi utilizado o método de superfície de resposta ternária para otimização do método.

#### *4.3. Avaliação da homogeneidade da mistura biodiesel e periodato para determinação de $\alpha$ - monoglicérides*

De acordo com as observações realizadas até aqui, foi realizado estudo que objetivou a avaliação da necessidade de formação de uma única fase homogênea entre os  $\alpha$  - monoglicérides e os íons periodato. Para tanto foram realizadas determinações espectrofotométrica e eletroforética das misturas de biodiesel, clorofórmio, água e etanol. Os dados foram tratados no “software” *Design Expert 7.1.6. Trial* e então obtidos os modelos matemáticos empíricos para previsão dos resultados experimentais.

Após tratamento dos dados foram construídos modelos matemáticos que respondessem linearmente para as três variáveis. Os modelos mais adequados foram: inverso, para turbidez e direto para teor de iodato. As equações que descrevem os dados experimentais são mostradas na Equação 4 e Equação 5, respectivamente.

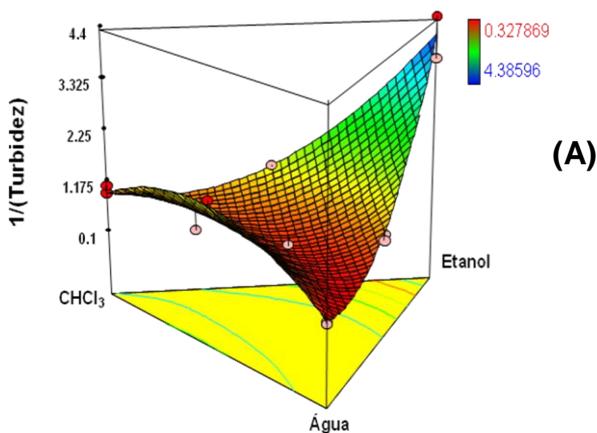
$$1/\text{Turbidez} = 0,0248 A + 0,8635 E + 0,1031 C - 0,1621 AE - 0,1517 EC \quad (4)$$

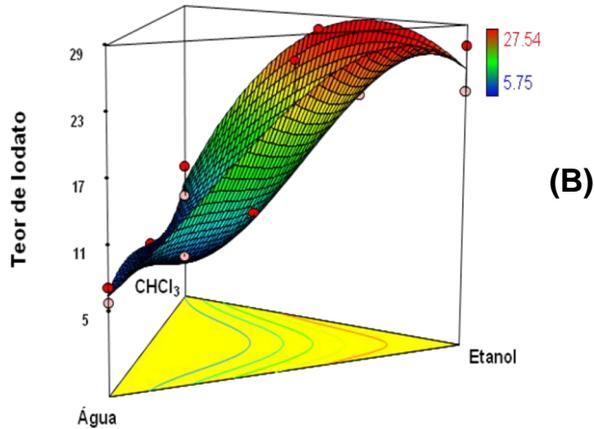
$$\text{Teor Iodato} = -1,319 A + 0,462 E - 1,105 C + 2,128 AE + 2,477 EC - 1,342 AEC \quad (5)$$

Nas equações, as variáveis são representadas por: água (A), etanol (E) e clorofórmio (C), estas mostraram - se significativas nas respostas, todas com efeito positivo para 1/turbidez e para teor de iodato negativo para água e clorofórmio. Percebe - se que a variável etanol em ambas as equações apresentou efeito positivo, ou seja, o aumento da proporção de etanol causa melhora tanto na homogeneidade da mistura

como no teor de iodato formado. As interações água/etanol (AE) e etanol/clorofórmio (EC) mostraram-se significativas, com efeito negativo para 1/turbidez e positivo para teor de iodato. A interação água/etanol/clorofórmio (AEC) apresentou efeito negativo para o teor de iodato. A variável de interação água/clorofórmio (AC) não apresentou efeito significativo, não fazendo parte dos modelos. As atribuições de significâncias ou não, foram dadas com nível de confiança de 95%.

A correlação linear entre os resultados experimentais e os gerados pelos modelos empíricos mostram valores de  $R^2$  igual a 0,899 e 0,882, respectivamente para 1/turbidez e teor de iodato. Estes valores de correlação mostram que o modelo pode ser utilizado para prever resultados experimentais variando a composição da mistura ternária dentro dos limites de máximo e mínimo dos componentes da mistura. Os gráficos de superfície (Figura 15) gerados a partir das equações mostram a dependência das medidas de 1/turbidez e teor de iodato com a composição da mistura.



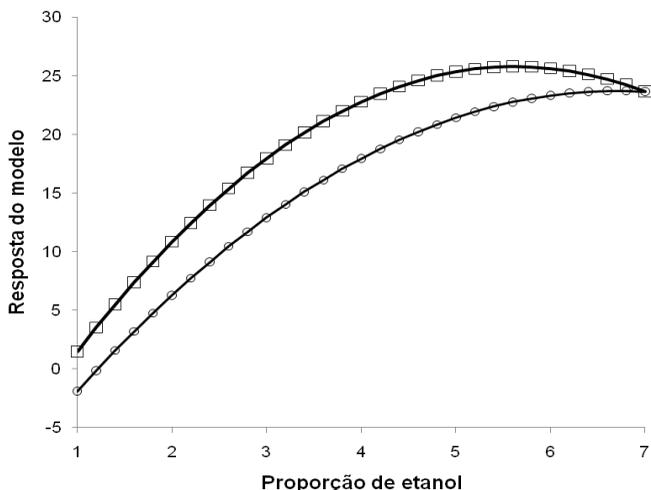


**Figura 15.** Superfície de resposta da mistura ternária de água, etanol e clorofórmio com relação: (A) Inverso da turbidez e (B) Teor de Iodato.

Observamos pelo gráfico A da Figura 15, que a homogeneidade da mistura ternária, aumenta conforme o aumento da proporção de etanol na mistura, ou seja, o máximo valor do inverso da turbidez é alcançado na composição de etanol:água:clorofórmio de (7:1:1). O gráfico B confirma a informação obtida pela medida da turbidez da mistura, onde o aumento da miscibilidade pelo aumento da proporção de etanol proporciona maiores áreas de iodato, observada na região vermelha da superfície.

Comparando os resultados das medidas de  $1/\text{turbidez}$  e teor de iodato, podemos inferir que a reação entre periodato e os  $\alpha$  - monoglicérides ocorre idealmente em meio homogêneo, em altas proporções de etanol na mistura observado pelo aumento da quantidade de iodato formado.

Para melhor visualização da composição ideal da mistura ternária que apresenta maior teor de iodato formado para determinação dos  $\alpha$  - monoglicérides, foi construído o gráfico da Figura 16 através da aplicação da Equação 5 para teor de iodato. Para tanto, foram fixadas as proporções de água e clorofórmio no valor mínimo e observada a tendência da resposta do modelo com a variação da proporção de etanol da mistura.



**Figura 16.** Resposta do modelo matemático para teor de iodato relacionado com a proporção de etanol na mistura ternária. Legenda: □ - Água constante; ○ - Clorofórmio constante.

Observou-se maiores respostas para área de iodato formado na curva em que o componente água foi mantido constante. Dessa forma, foram testadas quatro composições (Tabela 19), utilizando mesmo procedimento descrito no item 3.5.

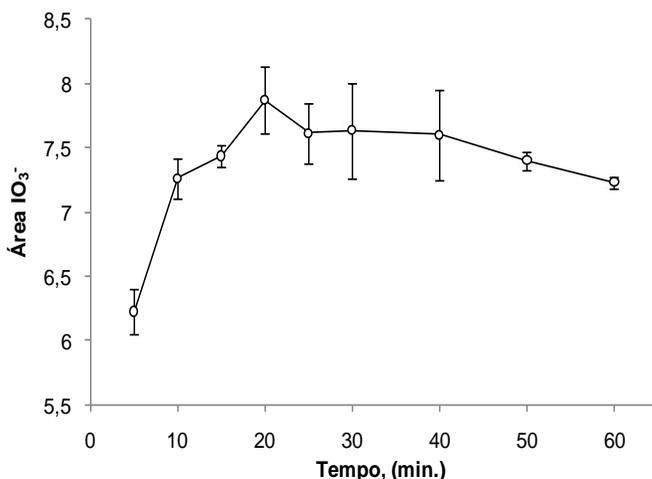
**Tabela 19.** Composição da mistura ternária.

<i>Condição</i>	<i>Etanol</i>	<i>CHCl<sub>3</sub></i>	<i>Água</i>	<i>Área iodato Determinado</i>	<i>Área iodato Equação</i>	<i>Correlação (%)</i>
<b>1</b>	6	2	1	25,7 ± 0,2	25,6	100,5
<b>2</b>	5,8	2,2	1	24,8 ± 0,5	25,8	95,9
<b>3</b>	5,6	2,4	1	24,2 ± 0,7	25,7	94,0
<b>4</b>	5,4	2,6	1	22,9 ± 0,2	25,7	89,0

Para todas as determinações realizadas, observou - se a boa correlação entre os valores de área de iodato previstos pelo modelo (Área iodato Equação) com os valores reais (Área iodato Determinado), obtidos experimentalmente. Assim, a combinação ideal da mistura ternária foi a condição de etanol/clorofórmio/água (6:2:1v/v/v).

#### 4.4. Estudo do tempo de reação de $\alpha$ – monoglicérideos na mistura ternária

Foi realizado estudo do tempo de reação entre periodato e os  $\alpha$  – monoglicérideos na mistura ternária. Para tanto foram realizadas nove ( $n = 9$ ) medidas seguindo procedimento de preparo de acordo com o item 3.4.2 com uma amostra de biodiesel de soja em duplicata de preparação e de leitura, com relação ao tempo de contato entre as fases sob agitação constante. A Figura 17, mostra o perfil da formação de iodato com o tempo de agitação.



**Figura 17.** Estudo do tempo de reação entre periodato e os  $\alpha$  – monoglicérideos em diferentes tempos de agitação na mistura ternária.

De acordo com observações do gráfico da Figura 17, podemos observar o aumento do teor de iodato formado até o tempo de 20 minutos de agitação da mistura reacional, quando observamos a tendência ao equilíbrio da reação avançando este tempo. Desta forma foi estabelecido o tempo de agitação em 30 minutos para preparo das amostras e curvas de calibração em função da estabilidade da área do iodato.

#### 4.5. Avaliação da curva de calibração

Para determinação quantitativa de amostras de biodiesel e óleo de soja, primeiramente foi construído curva de calibração de glicerina na

presença de etanol/clorofórmio/água na relação (6:2:1 v/v/v) na reação com periodato de sódio de acordo com *item 3.6*. Os resultados para curva de calibração, bem como alguns parâmetros de mérito são mostrados na Tabela 20.

**Tabela 20.** Parâmetros da curva de glicerina na mistura ternária.

	$a^a$	$b^a$	$R^2$	$LOD$ ( $mg\ kg^{-1}$ )	$LOQ$ ( $mg\ kg^{-1}$ )
<b>Glicerina</b>	$0,0231 \pm 0,0006$	$0,0483 \pm 0,0277$	$0,9983 \pm 0,0023$	$3,6 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,9$
$F_{cal}$	$F_{7,2} = 6,25$				
$F_{crit}$	$F_{7,2} = 39,36$				
<b>Faixa Linear (<math>mg\ L^{-1}</math>)</b>	<b>3,0 – 120</b>				

<sup>a</sup> (n = 3) curvas em diferentes dias e injetadas em duplicata.

Podemos observar na Tabela 20 um adequado coeficiente de determinação com valor superior a 0,998, bem como limites de detecção e quantificação adequados à aplicação da curva em quantificações de  $\alpha$  – monoglicerídeos dados pelos valores de 3,6 e 12,0 respectivamente.

Foi realizado o *teste F* [24] pela comparação dos desvios padrão dos coeficientes angular desta curva (Tabela 20) com relação à curva de glicerina somente em água (Tabela 17). Para tanto, foi considerada como hipótese nula que as variâncias dos coeficientes das curvas não apresentam diferença significativa no limite de 95 % de confiança. Como os valores *teste F* calculado ( $F_{cal}$ ) mostrou menor que o valor de  $F_{crit}$ , não podemos descartar a hipótese nula, sendo assim, os valores das variâncias das curvas não apresentam diferença significativa com 95 % de confiança. Posteriormente, foi realizado o *teste t*. A hipótese nula considerada foi que as curvas não apresentam diferenças significativas. Para 10 graus de liberdade o valor crítico de  $|t|$  é de 2,23 (P = 0,05). O valor observado de  $|t| = 0,21$  foi menor que o valor crítico, logo ambas as curvas não diferem significativamente no limite de 95 % de confiança.

De acordo com o descrito acima, a quantificação dos  $\alpha$  – monoglicerídeos pode ser realizada pela construção de curva de calibração para glicerina em água, tornando os procedimentos de análise menos laboriosos e sem modificações.

#### 4.6. Determinação quantitativa de amostras

Para determinação quantitativa das amostras, a curva de calibração utilizada foi a de glicerina preparada em água segundo procedimento de Gonçalves Filho e Micke [22, 23] com as melhorias estabelecidas no *item 4.1*. As amostras foram preparadas segundo procedimento descrito no *item 3.4.2*.

A aplicação do método proposto foi realizada para amostra de óleo de soja (matéria – prima) e biodiesel de soja mostrados na Tabela 21.

**Tabela 21.** Quantificação de  $\alpha$  – monoglicerídeos em amostras.

Amostra	monoglicerídeos totais (m/m)%		$\alpha$ – monoglicerídeos (m/m)%	
	CG <sup>a</sup>	CE <sup>b</sup>	RSD (%) intra - ensaios <sup>b,c</sup>	RSD (%) inter - ensaios <sup>b,d</sup>
<b>Óleo de soja</b>	0,18	0,041 ± 0,001	9,7 ± 1,3	13,6
<b>Biodiesel de soja</b>	0,44	0,083 ± 0,005	5,7 ± 2,4	6,8

<sup>a</sup>Método ASTM D6584; <sup>b</sup>Método proposto; <sup>c</sup>(n = 3); <sup>d</sup>(n = 5).

A avaliação intra - ensaio foi realizada pela injeção em triplicata da mesma preparação, já para avaliação inter - ensaios foram realizadas cinco preparações e injetadas em triplicata. Podemos observar que o RSD (%) das medidas intra - ensaios mostraram - se mais precisas que as realizadas em diferentes preparações.

Quanto aos resultados das quantificações podemos perceber a excelente melhora na precisão das medidas quando a reação de periodato e os  $\alpha$ – monoglicerídeos ocorre em meio homogêneo, sendo estes valores inferiores à 10 % para todas as amostras.

As análises realizadas pelo método oficial ASTM D6584, recomendado pela ANP fornece a porcentagem de monoglicerídeos totais sem distinção entre os isômeros de posição  $\alpha$  e  $\beta$ . A mesma observação se faz ao laudo fornecido pela empresa DANISCO<sup>®</sup> (Anexo 1).

Os teores de  $\alpha$ – monoglicerídeos nas amostras de óleo e biodiesel de soja foram menores comparados aos teores medidos pelo método oficial, como seria de se esperar, já que o método ASTM D6584 determina o teor total de monoglicerídeos, e não a especificação de seus isômeros. Estes resultados demonstram a potencialidade do método proposto.

## 5. CONCLUSÕES

O método otimizado para determinação de glicerina livre e total em biodiesel por eletroforese capilar foi aplicado com sucesso para medir o teor de  $\alpha$  - monoglicerídeos com poucas adaptações. Estas observações demonstraram a boa robustez do método frente a variações das condições experimentais e a aplicabilidade deste.

A estratégia de otimização da metodologia pela utilização de gráficos de superfície ternários para medidas de turbidez e teor de iodato, auxiliaram na visualização e escolha da condição ideal para determinação dos  $\alpha$  - monoglicerídeos. Da mesma forma que a formação de uma única fase miscível entre amostra e o periodato de sódio mostrou-se essencial no processo reacional, obtendo como resultado melhora nas precisões nas medidas.

O método proposto demonstrou boa perspectiva de aplicação ao estudo com um maior número de amostras.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ZHANG, Y.; STANCIULESCU, M.; IKURA, M. Rapid transesterification of soybean oil with phase transfer catalysts. *Applied Catalysis A*, v. 366, p. 176 – 183, 2009.
- [2] PLANK, C.; LORBEER, E. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 697, p. 461 - 468, 1995.
- [3] MITTELBACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils, V [1]: Gas chromatographic determination of free glycerol in transesterified vegetable oils. *Chromatographia*, v. 37, p. 623-626, 1993.
- [4] MITTELBACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: Specifications and quality control of biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 56, p. 7-11, 1996.
- [5] SCHUMACHER, L. G.; ELSER, N. *Sample Analysis From Biodiesel Test*. University of Missouri-Columbia. National Biodiesel Board, 1997, p. 180.
- [6] ANP - Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução nº 7 de 19 de março de 2008. *Regulamento Técnico*, n. 207/ 2008. Brasília: Diário Oficial da União.
- [7] DI NICOLA, G.; PACETTI, M.; POLONARA, F.; SANTORI, G.; STRYJEK, R. Development and optimization of a method for analyzing biodiesel mixtures with non aqueous reversed phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1190, p. 120 - 126, 2008.
- [8] FREEDMAN, B.; KWOLEK, W.F.; PRYDE, E.H. *J. Am. Oil Chem. Soc.* v. 63, p. 1370, 1986.
- [9] PLANK, C.; LORBEER, E. *J. High Resolution Chromatogr.* v. 609, p. 15, 1992.
- [10] HOLCAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER, J.; PROKES, B. *J. Chromatogr. A*, v. 858, p. 13, 1999.

- [11] TÜRKAN, A.; KALAY, Ş. Monitoring lipase – catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high – performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases. *J. Chromatogr. A*, v. 1127, p. 34 - 44, 2006.
- [12] DUBÉ, M.A.; ZHENG, S.; MCLEAN, D.D.; MORRIS, K. *J. Am. Oil Chem. Soc.* v. 81, p. 599, 2004.
- [13] XIE, W.; LI, H. *J. Am. Oil Chem. Soc.* v. 83, p. 869, 2006.
- [14] American Oil Chemists Society. (1998). *Official Methods and Recommended Practices*, 5th ed. Methods Ca 14-56 and Cd 11-57. The Society Champaign, IL. Reapproval November 3, 1999.
- [15] SUMAN, M.; SILVA, G.; CATELLANI, D.; BERSELLINI, U; CAFFARRA, V.; CARERI, M. Determination of food emulsifiers in commercial additives and food products by liquid chromatography/atmospheric-pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1216, p. 3758 - 3766, 2009.
- [16] AITZETMULLER, K. *J. Chromatogr.* v. 113, p. 231, 1975.
- [17] AITZETMULLER, K. *J. Chromatogr.* v. 139, p. 61, 1977.
- [18] SOE, J.B. *Fette Seifen Anstrichmittel.* v. 85, p.72, 1983.
- [19] LI, X. H.; LI, Y.; HUA, Y. F.; QIU, A. Y.; YANG, C.; CUI, S. Effect of concentration, ionic strength and freeze-drying on the heat-induced aggregation of soy proteins. *Food Chemistry*, v. 104, p.1410 – 1417, 2007.
- [20] LI, X. H.; CHENG, Y.; YI, C.; HUA, Y. F.; YANG, C.; CUI, S. Effect of ionic strength on the heat-induced soy protein aggregation and the phase separation of soy protein aggregate/dextran mixtures. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 1015 –1023, 2009.
- [21] Nephelometric Method 2130. *Standard Methods for the Examination of water and wastewater.* ed. 20th. Washington, DC, American Public Health Association.1998.

[22] GONÇALVES FILHO L. C., MICKE, G. A., Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis. *J. of Chromatogr. A*, v. 1154, p. 477-480, 2007.

[23] GONÇALVES FILHO L. C., MICKE, G. A. Determinação de glicerina total em amostras de biodiesel por eletroforese capilar. *Analytica*, n. 30, p. 82 – 88, 2007.

[24] MILLER, J. C.; MILLER, J. N. *Statistics for analytical chemistry*. Ellis Horwood PTR Prentice Hall. p. 233, 1993.

## *7. CONSIDERAÇÕES FINAIS*

A determinação dos cátions inorgânicos em biodiesel foi realizada com sucesso. Isto demonstra sua potencialidade na utilização em análises de rotina em função da rapidez, procedimento simples de preparo de amostras, e boa precisão dos resultados.

O desenvolvimento de metodologia para quantificação dos  $\alpha$  – monoglicerídeos através do método para determinação de glicerina livre e total de Gonçalves Filho L. C. e Micke, G. A. foi implementado com poucas modificações. Este trabalho terá continuidade para ser validado e aplicado em um maior número de amostras.

Por fim, eletroforese capilar demonstra sua potencialidade no emprego de estudos de desenvolvimento de metodologias alternativas ao controle de qualidade de biodiesel.

*ANEXO 1*

## APÊNDICE 1

### Estudo de Caso

#### 1. Conversão de óleo de *Pachyrhizus erosus* (L.) Urb em biodiesel

A *Pachyrhizus erosus* (L.) Urb., também conhecida como Jacatupé (Brasil), é uma planta leguminosa nativa do México e América Central. Esta planta é perfeitamente adaptável ao clima e solo Tropical e Subtropical da América do Sul, assim como no Sul do Brasil <sup>[1,2]</sup>. Algumas vantagens desta planta estão associadas à produção de grande quantidade de biomassa sem necessidade de fertilizantes <sup>[3,4]</sup> e suas raízes apresentam ótima importância econômica, no entanto, sua aplicabilidade como biodiesel é pouco conhecida <sup>[5]</sup>

Este trabalho objetivou o estudo da condição ideal de síntese de biodiesel a partir do óleo de *Pachyrhizus erosus* (L.) Urb. Utilizou-se planejamento fatorial e avaliação da conversão pela determinação de glicerina ligada mediante a determinação de glicerina livre e total.

#### 2. Planejamento e preparação das amostras

As condições de síntese do biodiesel foram otimizadas utilizando-se um planejamento experimental fracionário com triplicata no ponto central do tipo  $2_{iv}^{4-1}$  <sup>[6]</sup>. As variáveis estudadas e seus respectivos níveis são apresentadas na Tabela 1.

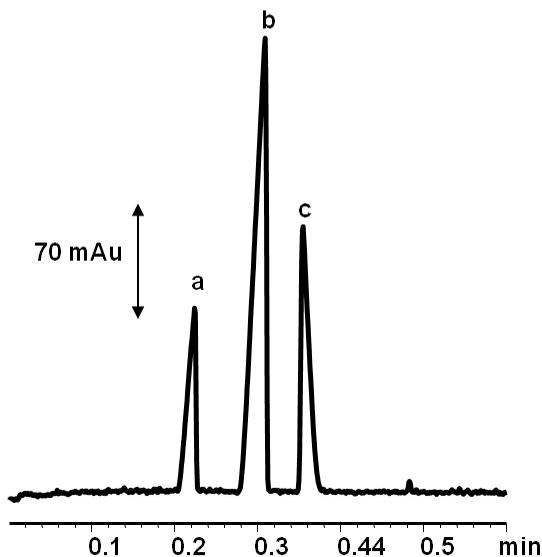
**Tabela 1.** Variáveis experimentais para o planejamento fatorial  $2_{iv}^{4-1}$ .

Variáveis	Códigos	Níveis		
		(-)	(+)	Ponto central (P <sub>c</sub> )
Temperatura (°C)	<i>T</i>	40	70	55
Tempo (h)	<i>t</i>	2	4	3
Catalisador (% m/m óleo)	<i>C</i>	0,6	1,2	0,9
Álcool:Óleo (mol)	<i>AO</i>	6:1	9:1	7.5:1

### 3. Resultados

#### 3.1. Análise por eletroforese capilar

O método de análise das amostras foi baseado em Gonçalves *et al* (2007) [7], onde a porcentagem de glicerina é determinada pela quantidade de iodato formado na reação com periodato de sódio. O perfil dos eletroferogramas das amostras é apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Eletroferograma característico das amostras. (a) nitrato - padrão interno, (b) periodato – oxidante, (c) iodato – produto da reação, proporcional à concentração de glicerina. Eletrólito composto de 20 mmol L<sup>-1</sup> de glicina e 10 mmol L<sup>-1</sup> de TFA (pH 2.6).

#### 3.2. Planejamento fatorial fracionário 2<sub>iv</sub><sup>4-1</sup>

A partir de um planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> para quatro variáveis (16 experimentos), foram escolhidos e analisados aleatoriamente 8 condições para síntese do biodiesel de *Pachyrhizus erosus* (L.) Urb. Foi então determinada a porcentagem de glicerina ligada, pelo conhecimento da glicerina livre e glicerina total determinadas por eletro-

forese capilar. Os resultados analíticos, e as condições experimentais da síntese das amostras são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Condições de síntese e resultados de glicerina livre e total.

Amostra	Condições de síntese				Resultados (% m/m) <sup>a</sup>
	<i>T</i>	<i>t</i>	<i>C</i>	<i>AO</i>	Glicerina ligada <sup>c</sup>
1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	0,197
10	+	-	-	+	0,193
11 <sup>b</sup>	-	+	-	+	0,152
4	+	+	-	-	0,229
13	-	-	+	+	0,129
6 <sup>b</sup>	+	-	+	-	0,233
7	-	+	+	-	0,160
16 <sup>b</sup>	+	+	+	+	0,012
P <sub>c</sub> <sup>d</sup>	55	3	0.9	7.5:1	0,185

<sup>a</sup> Porcentagem em massa de glicerina por massa de biodiesel, <sup>b</sup> Amostras em duplicata de síntese, <sup>c</sup> Resultados da média das duplicatas de análise (RSD: 0.002 – 0.04%), <sup>d</sup> Ponto central, análise em triplicata (RSD: 0.001% para GL ; 0.02% para GT).

Utilizando-se planilhas eletrônicas do Microsoft Excel <sup>[8]</sup> foram determinados os efeitos de cada variável bem como as interações, Tabela 3 observou-se que os fatores: catalisador e relação álcool/óleo tem efeito 95% significativo na resposta, com valor negativo, ou seja, ao passarmos do nível (-) para o (+) ocorre a diminuição do valor de glicerina ligada. O aumento do tempo de síntese ocasiona diminuição da resposta, observado pelo seu efeito negativo. Todos os efeitos de interação não mostram significância no nível de 95% de confiança. O fator temperatura apresentou efeito positivo e não significativo, verificado pelo valor do efeito ser menor do que a própria incerteza da medida. Phan *et al*, relatam que em síntese de biodiesel em temperaturas acima de 70 °C há uma diminuição da conversão do óleo devido à competição dos processos de transesterificação e saponificação <sup>[9]</sup>.

A partir dos dados da Tabela 2 foram obtidos os coeficientes do modelo. Na Equação 1 são descritos apenas os coeficientes significativos.

$$y = b_0 + b_1T + b_2t + b_3C + b_4AO + b_{12}Tt + b_{13}TC + b_{14}TAO + e \quad (1)$$

Onde, o coeficiente  $b_0$  é o valor populacional da média de todas as respostas obtidas,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  e  $b_4$  são os coeficientes relacionados com as variáveis  $T$ ,  $t$ ,  $C$  e  $AO$  respectivamente,  $e$  é o erro aleatório associado ao modelo,  $b_{12}$ ,  $b_{13}$  e  $b_{14}$  são os coeficientes para as interações  $Tt$ ,  $TC$  e  $TAO$ . Os coeficientes são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Coeficientes do modelo empírico para Glicerina ligada.

<i>Coeficiente</i>	<i>Glicerina Ligada</i>
$b_0$	$0,16836 \pm 0,0056$
$b_1$	$0,0055 \pm 0,0131$
$b_2$	$-0,0515 \pm 0,0131$
$b_3$	$-0,061 \pm 0,0131$
$b_4$	$-0,085 \pm 0,0131$
$b_1b_2$	$-0,0445 \pm 0,0131$
$b_1b_3$	$-0,031 \pm 0,0131$
$b_1b_4$	$-0,047 \pm 0,0131$

A fim de verificar previsões feitas com o modelo obtido pela Equação 1 bem como a utilização de uma fração do planejamento fatorial completo foi realizado um novo experimento utilizando-se níveis não incluídos na obtenção do modelo. O modelo foi avaliado mediante análise de uma amostra nas seguintes condições de síntese: 70 °C ; 2h ; 1,2 (% m/m óleo) e 9:1 (mol). Pela previsão matemática o valor da glicerina ligada seria de 0,110 % sendo obtido experimentalmente um valor de 0,142 %. Dentro desta diferença de resultados, estão incluídos os erros experimentais de síntese e de análise.

O modelo foi aplicado para encontrar a melhor condição experimental, levando em consideração outras combinações dos fatores. Para todas as combinações simuladas a condição experimental que apresentou melhores resultados de conversão do óleo foi a condição 16 (Tabela 2), ou seja, todos os fatores nas condições superiores.

#### 4. Referências bibliográficas

- [1] MERCADO-SILVA, E.; GARCIA, R.; HEREDIA-ZEPEDA, A.; CANTWELL, M. Development of chilling injury in five jicama cultivars. *Postharvest Biology and Technology*. v. 13, p. 37–43, 1998.
- [2] NOMAN, A.S.M.; HOQUE, M.A.; SEN, P.K.; KARIM, M.R. Purification and some properties of a amylase from post-harvest *Pachyrhizus erosus* L.tuber. *Food Chemistry*. v. 99, p. 444-449, 2006.

- [3] CASTELLANOS, J.Z., ZAPATA, F., BADILLO, V., PEÑA-CABRIALES, J. J., JENSEN, E. S., HEREDIA-GARCÍA, E. Symbiotic nitrogen fixation and yield of *Pachyrhizus erosus* (L) urban cultivars and *Pachyrhizus ahipa* (WEDD) parodi landraces as affected by flower pruning. *Soil Biology and Biochemistry*. v. 29, p. 973-981, 1997.
- [4] MORALEZ-ARELLANO, G.Y., CHAGOLLA-LOPEZ, A., PAREDES-LÓPEZ, O., ROSA, A.P.B. Characterization of Yam Bean (*Pachyrhizus erosus*) Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 49, p. 1512-1516, 2001.
- [5] GOMES, A.V.; SIRJU-CHARRAN, G.; BARNES, J.A. Major proteins of yam bean tubers. *Phytochemistry*. v. 46. p.185 – 193, 1997.
- [6] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. *Quím. Nova*. 29 (2006) 338.
- [7] GONÇALVES FILHO L. C., MICKE, G. A., Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis. *J. of Chromatogr. A*, v. 1154, p. 477-480, 2007.
- [8] Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais. Disponível em: <<http://lqta.iqm.unicamp.br>>. Acessada em 10 de dez. 2009.
- [9] PHAN, A. N.; PHAN, T. M. *Fuel*. v. 87, p. 3490, 2008.