UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Mauricio Sodré Ribeiro

Desenvolvimento de procedimento analítico para a
determinação *in situ* de glicerol livre em biodiesel

Versão corrigida da dissertação defendida

São Paulo

Data de depósito na SPG:

12 de Setembro de 2011

MAURICIO SODRÉ RIBEIRO

**Desenvolvimento de procedimento analítico para a
determinação *in situ* de glicerol livre em biodiesel**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Química (Química Analítica)*

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

São Paulo
2011

Mauricio Sodré Ribeiro

Desenvolvimento de procedimento analítico para a determinação *in situ* de glicerol livre em biodiesel.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química (Química Analítica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fábio Rocha pela orientação, atenção, liberdade de expressão e criação, que permitiu desenvolver meu pensamento crítico, sempre contribuindo com suas colocações pertinentes, as quais somaram e ampliaram meus conhecimentos. Uma pessoa formidável que admiro pela sua competência, dedicação, serenidade e alegria no que faz. Agradeço-o pelos bons momentos, desde a iniciação científica até hoje, dos quais fizeram nascer o respeito e a amizade.

Aos Professores Mauro Bertotti e Thiago Régis Longo César da Paixão pela participação no Exame de Qualificação e pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

Aos Professores Pedro Vitoriano de Oliveira e Pérola de Castro Vasconcellos pela oportunidade de participar, como monitor, da disciplina de Química Analítica Instrumental, ministrada para o curso de Química Ambiental e Licenciatura em Química do Instituto de Química desta Universidade.

Aos Professores Thiago R. L. C. Paixão, Pedro V. Oliveira, Cassiana S. Nomura e Lúcio Angnes que, gentilmente, abriram as portas de seus laboratórios, disponibilizando equipamentos e comentários pertinentes, os quais contribuíram para realização deste trabalho.

Aos amigos e companheiros de laboratório, Mariana Sanchez, Wanessa Melchert, Diogo Rocha e Sidnei Gonçalves pelas contribuições e bons momentos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas e apoio financeiro.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) e aos funcionários.

À minha mãe Regina, pelo amor e carinho. A qual nunca decidiu os caminhos que eu deveria traçar na minha vida, mas me ensinou e me deu princípios e discernimento para que eu pudesse fazê-los de maneira sábia e vencedora.

Ao meu pai Claudio, que com o seu jeito singelo e simples de ser, me transmitiu habilidades artesanais, de construção e invenção.

Aos meus irmãos Mirella e Marcelo, pelas brigas, conversas, carinhos, risadas e alegria que me ensinaram a perdoar e a amar.

Ao meu sobrinho Gustavo, que mudou minha concepção de “vida” e me mostrou que ela nos deixa frutos e sementes para um novo futuro.

Ao meu novo irmão Guilherme, pai do Gustavo, pelas dicas, ajudas gráficas e pelos momentos de alegria e felicidade que a mais de uma década compartilha e faz parte da minha família.

Ao meu avô José, pelas palavras sábias que contribuíram para a formação do cidadão ético, que julgo ser. E daquelas que me fazem pensar na vida e me levaram muitas vezes a viagens no tempo, as quais me retratam, com detalhes, a cidade em que nasci, no século que passou e que nunca poderão ser vistas em fotos.

À minha avó Nega, que sempre cuidou dos filhos e netos com o mesmo carinho e amor e pelos deliciosos almoços de domingo em sua casa.

Ao meu eterno avô Roldão, que nos deixou e levou o segredo de um bom dançarino e de como ser feliz nos compassos e ritmo de nossas vidas, antes mesmo que pudesse adquiri-los diretamente e de maneira fácil. À sua esposa, minha avó Maria, que há dois anos foi reencontrar seu amor “Dão”, mas deixou a saudade o amor, o carinho e os passeios pela cidade com seu neto.

Às minhas tias Maria, Miriam, Sueli e Sonia pelo carinho e amor de mãe que sempre me deram. E aos meus tios Waldemar e Ricardo, às minhas primas Thaís e Patrícia e primo Thiago, pelo apoio e incentivos nos momentos difíceis e das risadas dos momentos alegres e descontração.

E por fim, mas não menos importante, à minha companheira e amiga Patrícia Sanches pelo amor, carinho, pelos bons momentos e contribuições durante estes dois anos.

RESUMO

Ribeiro, M.S. Desenvolvimento de procedimento analítico para a determinação *in situ* de glicerol livre em biodiesel. 2011. 77p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O biodiesel é um biocombustível proveniente de fontes renováveis, que pode ser obtido a partir da transesterificação de óleos vegetais e/ou gordura animal, produzindo alquil-ésteres de ácidos graxos e um importante resíduo, o glicerol. Este coproduto deve ser removido para a comercialização do biocombustível, pois concentrações altas podem causar danos aos motores de ciclo diesel, além da produção de gases altamente tóxicos durante a combustão. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um procedimento analítico empregando um sistema de fase única para a determinação *in situ* de glicerol livre em biodiesel. Procedimentos analíticos para análises *in situ* trazem vantagens, tais como rapidez na resposta ao monitoramento de um processo industrial, evitando trabalhos de reprocessamento, ou no *screening* de amostras durante fiscalizações em campo, permitindo não só tomadas de decisões imediatas, como também no encaminhamento de apenas amostras duvidosas para análises laboratoriais mais detalhadas. As análises *in situ* devem ter como principais características a praticidade, rapidez, robustez, uso de reagentes estáveis e pouco tóxicos e possibilidade de emprego de instrumentos portáteis. O procedimento desenvolvido é baseado na oxidação do glicerol por periodato gerando formaldeído, ácido fórmico e iodato. O formaldeído reage com acetilacetona, em meio amoniacal, formando o composto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (reação de Hantzsch). Este composto apresenta máximo de absorção em 410 nm e pode ser quantificado por espectrofotometria. A extração do analito, geralmente empregada nos procedimentos propostos na literatura, foi evitada. As amostras de biodiesel foram diluídas 10 vezes em etanol anidro. Aquecimento a 50°C por 10 minutos foi empregado para acelerar a reação. A solução final deve conter, no mínimo, 75% de etanol para garantir a formação de uma única fase para que possa ser realizada a medida espectrofotométrica. Resposta linear foi observada entre 40 e 400 mg kg⁻¹ de glicerol, sendo a curva analítica representada pela equação: $A = 0,0018C + 0,0204$, $r^2 = 0,999$, em que C é a concentração de glicerol em mg kg⁻¹. O limite de detecção foi estimado em 2,0 mg kg⁻¹ (99,7% de nível de confiança; n = 10) e o coeficiente de variação em 2,1% (n=10). O procedimento proposto foi aplicado a amostras de biodiesel de diferentes fontes oleaginosas, com resultados concordantes com o procedimento de referência em nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: glicerol livre, biodiesel, sistema em fase única, análises *in situ*.

ABSTRACT

Ribeiro M.S. Development of an analytical procedure for *in situ* determination of free glycerol in biodiesel. 2011. 77p. Master's Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Biodiesel can be obtained from renewable sources by trans-esterification of vegetable oils or animal fats, producing alkyl esters of fatty acids and glycerol as side product. Glycerol need to be removed for commercialization of the biofuel, because high concentrations can damage motors, and produce highly toxic gases during combustion. The objective of this study was to develop a procedure for *in situ* analysis of free glycerol in biodiesel samples employing a single-phase system. Procedures for *in situ* analysis show advantages such as fast response in monitoring of industrial processes, avoiding the need for reprocessing of a production batch, or for screening of samples during field inspections, thus allowing fast decisions as well as reduction of the number of samples sent to a more detailed laboratory analysis. The *in situ* analysis requires practical, fast, and robust procedures, which uses stable and low toxicity reagents, and presents potential for use of portable instruments. The developed procedure is based on glycerol oxidation by periodate, which yields formaldehyde, formic acid and iodate. Formaldehyde reacts with acetylacetone in an ammoniacal medium, forming the 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine (Hantzsch's reaction). This compound can be quantified by spectrophotometry with maximum absorption at 410 nm. The analyte extraction, usually employed in previously proposed procedures, was avoided. The biodiesel samples were 10-fold diluted in anhydrous ethanol. In order to accelerate the reaction, the flasks were heated at 50 °C for 10 minutes. The final solution should contain at least 75% ethanol to ensure the formation of a single phase before the spectrophotometric measurements. A linear response was observed from 40 to 400 mg kg⁻¹ of glycerol ($A = 0.0018 C + 0.0204$, $r^2 = 0.999$, in which C is the concentration of glycerol in mg kg⁻¹). The detection limit was estimated at 2.0 mg kg⁻¹ (99.7% confidence level, n = 10) and the coefficient of variation was 2.1% (n = 10). The proposed procedure was applied to biodiesel samples from different oil sources and the results agreed with the reference procedure at the 95% confidence level.

Keywords: free glycerol, biodiesel, single-phase procedure, *in situ* analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Absorbância.

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.

ASTM – Sociedade Norte Americana de Normatização (do inglês *American Society for Testing and Materials*).

C_{glicerol} – Concentração de glicerol em mg kg⁻¹.

CG – Cromatografia a Gás.

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

EN – Comité Europeu de Normatização (do inglês *European Standard*).

HAc – Ácido Acético.

n – número de replicatas.

NH₄Ac – Acetato de amônio.

KIO₄ – Metaperiodato de potássio.

USB – Porta serial universal (do Inglês *Universal Serial Bus*).

UV-Vis – Espectroscopia de Absorção molecular no ultravioleta e visível.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características analíticas de alguns procedimentos para a determinação de glicerol livre em biodiesel.	24
Tabela 2: Variação dos Sinais analíticos e branco com o tempo de oxidação do glicerol pelo metaperiodato de potássio.	51
Tabela 3: Sinais analíticos obtidos variando o tempo de reação sob aquecimento a 50°C para uma amostra de biodiesel.	56
Tabela 4: Quantidade de etanol necessária para a formação de uma única fase no procedimento para a quantificação de glicerol em diferentes amostras de biodiesel.	57
Tabela 5: Parâmetros otimizados para a determinação de glicerol livre em biodiesel empregando sistema de fase única.....	58
Tabela 6: Valores das concentrações obtidas na determinação de glicerol livre em biodiesel pelos procedimentos proposto e de referência.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama das etapas envolvidas no procedimento proposto para a determinação de glicerol livre em biodiesel em sistema de fase única	35
Figura 2: Esquema da reação de oxidação do glicerol por periodato de potássio. ...	41
Figura 3: Esquema da reação entre o formaldeído e a acetilacetona em meio amoniacal.	41
Figura 4: Espectros de absorção da (a) 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina e (b) branco.	42
Figura 5: Efeito da porcentagem de etanol sobre o sinal analítico (a) e do branco (b) para o processo de extração de glicerol livre em amostra de biodiesel..	44
Figura 6: Estudo cinético da formação do reagente fluoral P em meio de tampão ácido acético/acetato de amônio.	45
Figura 7: Estudo cinético da reação de formação do 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (a) e variação do sinal de branco (b) em meio aquo-etanólico.....	47
Figura 8: Estudo cinético da reação de formação da 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina em meio (a) etanólico e (b) aquoso.....	48
Figura 9: Efeito da concentração de metaperiodato de potássio sobre o sinal de (a) 1,67 mg L ⁻¹ glicerol e (b) branco.....	52
Figura 10: Estudo cinético da reação entre formaldeído e <i>fluoral P</i> (a) 24, (b) 40 e (c) 50°C..	54
Figura 11: Efeito da concentração de acetilacetona sobre os sinais (a) analítico e (b) branco. Temperatura de reação 50°C..	55
Figura 12: Curva de calibração para a determinação de glicerol em sistema de fase única.....	59
Figura 13: Curvas de calibração em meio à amostra de biodiesel oriundas de diferentes matérias-primas.	60
Figura 14: Espectros de absorção de amostras de biodiesel de diferentes matérias-primas diluídas 10 vezes em etanol anidro.	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Análises <i>in situ</i>	20
1.2. Determinação de glicerol livre em biodiesel.....	22
1.3. Objetivos	27
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	29
2.1. Equipamentos e acessórios	31
2.2. Reagentes e soluções.....	31
2.3. Estratégias para o preparo de amostras	32
2.4. Estudos cinéticos	33
2.4.1. Condições do meio para a formação da 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina	33
2.4.2. Formação do reagente fluoral P.....	34
2.5. Procedimento para a determinação de glicerol livre em biodiesel empregando sistema de fase única para análise <i>in situ</i>	35
2.6. Procedimento de referência	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
3.1. Estudos preliminares.....	43
3.1.1. Extração.....	43
3.1.2. Estudos cinéticos.....	45
3.1.3. Ordem de adição dos reagentes	49
3.1.4. Diluição da amostra	50
3.2. Otimização	51
3.2.1. Oxidação do glicerol	51
3.2.2. Reação de Hantzsch	53
3.2.3. Efeito da temperatura e do tempo para as reações em meio da amostra	55
3.2.4. Efeito da quantidade de etanol para a formação de uma única fase.....	57
3.3. Características analíticas	59
3.4. Avaliação de efeitos de matriz	60
3.4.1. Compensação de sinal espúrio devido à absorção de radiação pela amostra..	61
3.5. Comparação com procedimento de referência	62
4. CONCLUSÕES.....	65
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1

Introdução

1. Introdução

Desde a invenção do motor a diesel, por Rudolf Diesel em 1897, o consumo de petróleo e derivados vem crescendo exponencialmente em função das demandas de mercado¹. No entanto, conjuntamente surgiram problemas ambientais, tais como derramamentos de óleo e emissão de gases tóxicos e de efeito estufa na atmosfera, além de conflitos políticos entre alguns países que detêm reservas de petróleo.

Nas últimas décadas, muitos eventos históricos podem ser direta ou indiretamente relacionados à disputa pelo petróleo. Entre eles destacam-se a crise petrolífera das décadas de 1970 e 1980, a Guerra das Malvinas (1982), a Guerra do Afeganistão (2001) e, mais recentemente, a invasão dos EUA ao Iraque (2003).

A extração de petróleo oferece riscos e pode trazer prejuízos ambientais. Um exemplo é a plataforma de extração da empresa *British Petroleum*, localizada no Golfo do México, que naufragou no Mar do Caribe em abril de 2010. Durante 87 dias, mais de 4,9 milhões de barris de petróleo foram lançados nas águas do Golfo do México e os esforços para conter o vazamento foram em vão. Este acidente foi considerado o maior desastre ambiental devido à exploração de petróleo, trazendo danos irreparáveis à biota marinha e à vida de milhões de pessoas da região. A empresa informou que o custo para conter o vazamento de petróleo ultrapassou os 760 milhões de dólares².

O uso de combustíveis fósseis como fonte de energia automotiva afeta diretamente o meio urbano. Durante a combustão, são produzidos diversos gases e materiais particulados prejudiciais à saúde humana. Entre os gases produzidos, destacam-se o monóxido e o dióxido de carbono, além de compostos de nitrogênio e enxofre. Entre os combustíveis derivados do petróleo, o óleo diesel é o principal

responsável pela emissão de compostos de enxofre para a atmosfera, acarretando problemas respiratórios à população e propiciando as chuvas ácidas.

A crise energética na década de 1970 desencadeou a procura por novas alternativas energéticas para a substituição de combustíveis fósseis. Neste cenário, o Brasil foi pioneiro na produção e implantação do álcool etílico combustível gerado a partir da fermentação da cana-de-açúcar, além da fabricação de veículos automotivos movidos exclusivamente com este biocombustível. Atualmente, a maior parte dos pequenos automóveis fabricados e comercializados no Brasil são bicomcombustíveis, ou seja, podem utilizar tanto a gasolina quanto o etanol combustível. A produção de etanol combustível e sua introdução na matriz energética brasileira foram possíveis devido aos incentivos do programa PROÁLCOOL do Governo Federal. Juntamente a este programa, o Brasil criou o PRO-ÓLEO, elaborado pela Comissão Nacional de Energia, o qual previa a regulamentação de uma mistura de 30% de óleo vegetal ou derivado no óleo diesel e uma substituição geral a longo prazo³. O programa também propunha como alternativa tecnológica a transesterificação ou alcoólise destes óleos, gerando os primeiros depósitos de patentes neste setor. Entretanto, com a queda do preço do petróleo, o projeto PRO-ÓLEO foi abandonado no ano de 1986, mas as pesquisas continuaram sendo realizadas.

Nas últimas décadas, técnicas para a produção de biodiesel, combustível biodegradável derivado de fontes renováveis, têm sido aprimoradas. Diferentemente dos combustíveis fósseis, oriundos de fontes esgotáveis, o biodiesel provém de vegetais oleaginosos ou gordura animal, constituindo uma fonte alternativa e menos poluente. Estudos apontam que o uso deste biocombustível diminui a emissão de gases relacionados ao efeito estufa, como o monóxido de carbono, além de

apresentar baixo teor de compostos sulfurosos e ausência de compostos aromáticos⁴. O biodiesel pode ser obtido através da reação de transesterificação de gorduras vegetais ou animais, com álcoois (metanol ou etanol), na presença de um catalisador (usualmente uma base forte), gerando os alquil ésteres correspondentes. Os excessos de reagente e catalisador e o coproduto formado na reação (glicerol) devem ser removidos do biocombustível através de sucessivas lavagens com água.

O biodiesel pode ser utilizado puro ou em mistura com o diesel de petróleo. Esta blenda recebe o nome de “BX”, onde “B” designa a mistura de biodiesel e diesel, e o “X” a porcentagem do biocombustível. Assim, B2 e B30 correspondem, respectivamente, a 2 e 30% de biodiesel no diesel e o biodiesel puro recebe a designação de B100.

Em maio de 2005, através do Decreto nº 5.457, foi regulamentada a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, a qual estabelecia a meta de adição de 2% de biodiesel no diesel. A produção deste biocombustível passou de 74 m³/mês em 2005, a 5.750 m³/mês em 2006 e 33.694 m³/mês em 2007. Este aumento substancial na produção permitiu ao governo alterar a quantidade de biodiesel no diesel, passando a vigorar o B3 em março de 2008, medida que foi sustentada até 1º de janeiro de 2010, quando passou a ser comercializado o B5. Neste ano, a produção de biodiesel no país chegou a 2,4 bilhões de litros. O aumento percentual de adição de biodiesel ao diesel reflete o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, mantendo o país entre os maiores produtores e consumidores deste biocombustível no mundo⁵.

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), órgão do governo que regulamenta a produção, a qualidade e a comercialização de combustíveis no país, o Brasil possui 69 plantas produtoras de

biodiesel em operação, podendo produzir até 17000 m³/dia de biodiesel. Entre as matérias primas utilizadas para a produção deste biocombustível, o óleo de soja representa 83,66% da produção no país, seguido pela gordura bovina (13,82%) e 2,52% referente a óleo de algodão, gordura de porco, óleo de fritura usado e outros materiais graxos, segundo boletim mensal referente ao mês de março de 2011⁵.

Embora o Brasil seja um dos países que mais produz álcool etílico no mundo, o metanol ainda é o reagente predominantemente empregado para a produção de biodiesel no país. Isto se dá, pois a reação de transesterificação em meio de álcool metílico é mais rápida e requer menor excesso deste reagente. Estas características permitem não só maior rapidez no processo quanto menor geração de resíduos e utilização de reagentes⁶.

Para a comercialização, o biodiesel deve atender a algumas exigências que garantam sua qualidade⁷. Para isto, a ANP criou políticas específicas de avaliação da qualidade dos combustíveis que são comercializados em todo o país. Desta forma, os combustíveis devem ser submetidos a uma série de ensaios, nos quais são avaliados diversos parâmetros físico-químicos. Embora os protocolos analíticos recomendados pela ANP gerem resultados consistentes para o controle da qualidade de combustíveis, muitos ensaios são caros e trabalhosos sendo, na sua maioria, baseados em métodos volumétricos e cromatográficos desenvolvidos na primeira metade do século XX. Desta maneira, além de apresentarem baixa frequência analítica, os procedimentos consomem quantidades elevadas de reagentes e solventes, muitas vezes nocivos ao ambiente. Estes fatores fazem com que os métodos empregados não acompanhem a crescente demanda de análises neste setor.

Diversos fatores, como a matéria-prima empregada, os processos de produção e purificação, o armazenamento e o transporte podem influenciar a qualidade do combustível, dada pela sua composição química e propriedades físicas. Desta maneira, é necessária a quantificação de contaminantes, como resíduos, catalisador, álcoois, mono-, di- e triglicerídeos e, principalmente, o glicerol livre, que são indesejados no produto final. A técnica analítica usualmente empregada para análise da maioria destes parâmetros é a cromatografia a gás (CG). Embora esta técnica apresente alta precisão na quantificação de componentes orgânicos em baixas concentrações, o procedimento preconizado pela ANP apresenta problemas como desvio da linha base, sobreposição dos picos e a instabilidade dos padrões, afetando a repetibilidade e a reprodutibilidade⁸. Tal efeito também pode ser atribuído à necessidade de derivação química para a determinação de alguns analitos.

Embora seja uma técnica analítica menos usual que a cromatografia a gás na análise de biodiesel, a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) é também explorada para a caracterização de biodiesel, e tem como vantagens menor tempo de análise⁹⁻¹¹. Entretanto, as técnicas de CG e CLAE geralmente necessitam de etapas trabalhosas de preparo de amostras, o que pode aumentar o tempo gasto por análise e a incerteza do resultado final. Por fim, são técnicas que necessitam de reagentes, solventes e gases de alta pureza, possuem um custo relativamente alto de manutenção e necessitam que as amostras sejam coletadas e transportadas até o laboratório, o que deve ser feito de maneira adequada para que não haja perda do analito por evaporação ou transformação química¹². Por exemplo, a quantificação de metanol em biodiesel.

Novos procedimentos vêm sendo desenvolvidos para aumentar a produtividade de laboratórios analíticos^{10, 13-16}. Entretanto, o fator limitante para a emissão dos laudos de análises e detecção de não conformidades é dado pelo tempo gasto desde a coleta até a emissão dos resultados analíticos. Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de procedimentos simples, rápidos, de baixo custo e de menor impacto ambiental que possam ser realizados no local da amostragem para a determinação dos principais parâmetros de qualidade do biodiesel. Tais procedimentos requerem equipamentos portáteis e de simples manuseio, que possibilitem estimativas confiáveis e a redução do número de amostras encaminhadas aos laboratórios.

1.1. *Análises in situ*

Entende-se por “análises *in situ*”, procedimentos analíticos que são realizados no local da amostragem. Este tipo de análise possibilita que a resposta a um dado problema analítico seja obtida de maneira quase que instantânea quando comparada com as análises em laboratório. Isto permite tomadas de decisões rápidas durante um processo industrial, evitando perdas ou necessidade de reprocessamento.

A química analítica de processos (QAP)^{17, 18} busca desenvolver e estabelecer procedimentos para análises de produtos e/ou processos na indústria química. Define e classifica os diferentes tipos de análises químicas, considerando o local e a forma em que são realizadas. As análises *off-line* correspondem aos procedimentos que ocorrem dentro de um laboratório. A amostra é coletada, armazenada e transportada para um laboratório, que deve contar com equipamentos e condições adequadas de segurança. Desta forma, poderão ser desenvolvidas cuidadosamente

as etapas de preparo de amostra e análise em instrumentação sofisticada sob uma atmosfera controlada. A estabilidade do analito deve ser garantida durante o transporte e armazenagem da amostra.

Segundo a QAP, as análises *in situ* são classificadas de acordo com a forma de amostragem e posicionamento do equipamento e/ou detector. As análises do tipo *on-line* são definidas pela amostragem automatizada de uma alíquota do produto, ou intermediário, durante a produção, podendo ou não receber tratamento em linha antes de ser inserida mecanicamente em um equipamento para análises. Quando o detector é inserido na linha de processo, a análise é chamada de *in-line*.

As análises *in situ* também podem auxiliar no mapeamento de áreas contaminadas para estudos ambientais ou no *screening* de amostras duvidosas que devem ser encaminhadas a um laboratório para análises mais detalhadas, como na fiscalização de combustíveis em postos de abastecimento. Quando as amostras são coletadas manualmente e analisadas em um equipamento portátil disposto ao lado, esta é chamada, segundo a QAP, de análise do tipo *at-line*. Nestes casos, as amostras podem sofrer pré-tratamentos antes da análise instrumental, desde que estes sejam simples, com poucas etapas e que os reagentes sejam estáveis e não tóxicos. Desta forma, o procedimento *in situ* deve ser prático, robusto e portátil. Na literatura, existem diversos trabalhos que propõem procedimentos e equipamentos portáteis, especialmente para análise de amostras de interesse ambiental¹⁹⁻²².

Existem no mercado diversos equipamentos portáteis, tais como fotômetros e espectrofotômetros UV-Vis e infravermelho, fluorímetros e espectrofluorímetros, equipamentos de fluorescência de raios-x, entre outros, que permitem realizar medidas em campo. Embora estes equipamentos estejam disponíveis no mercado, procedimentos para aplicação em campo ainda são escassos.

Diversos trabalhos na literatura utilizando sistemas *in-line* e *on-line*, como cromatografia a líquido²³, cromatografia a gás²⁴⁻²⁶, espectrofotometria UV-Vis²⁷, infravermelho²⁸, Raman²⁹ e ressonância magnética nuclear³⁰ já foram descritos para monitoramento do processo de produção de biodiesel. Entretanto, todos os trabalhos visaram monitorar o rendimento do processo durante a reação de transesterificação e nenhum estudo foi voltado ao monitoramento de parâmetros como glicerol livre em biodiesel após a etapa de lavagem.

1.2. *Determinação de glicerol livre em biodiesel*

O glicerol, também chamado de glicerina, possui diversas aplicações na indústria química³¹. Entretanto, na produção de biodiesel, este coproduto deve ser extraído do produto final utilizando lavagem com água. O glicerol residual presente no biodiesel pode causar entupimento dos bicos injetores dos motores a diesel e a geração de gases altamente tóxicos durante a combustão, como a acroleína^{32, 33}.

Embora existam muitos procedimentos para a determinação de glicerol livre em biodiesel, a maioria emprega equipamentos sofisticados e de grande porte e requer trabalhosas etapas de preparo de amostra. Desta forma, todos apresentam a desvantagem de despenderem muito tempo entre a amostragem e a emissão dos resultados. A Tabela 1 apresenta alguns procedimentos para a determinação de glicerol livre em biodiesel.

Segundo a Resolução nº 7 de 2008 da ANP⁷, o limite máximo de glicerol livre em biodiesel é 0,02% (m/m). Este valor é concordante com o estabelecido pelas normas Norte-americana (ASTM D 6584)³⁴ e Europeia (EN 14106), que recomendam métodos analíticos baseados em cromatografia a gás³⁵. Este procedimento permite não só a quantificação de glicerol livre, mas também de mono-

, di- e triglicerídeos em biodiesel. Para a determinação destes componentes, os analitos devem, inicialmente, sofrer uma sililação nos grupos hidroxila, empregando o N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) como derivatizante. No procedimento por CG também é empregado o 1,2,4-butanotriol como padrão interno. Esta metodologia apresenta problemas pois, em algumas amostras, traços de produtos voláteis, tais como solventes empregados em carregadores para aditivos ou hidrocarbonetos, podem causar interferências na determinação de glicerol⁸. O método também não apresenta repetibilidade e reprodutibilidade satisfatórias, o que pode ser atribuído à derivatização química do analito. Ademais, o tempo de análise instrumental, sem considerar tempo para o preparo da amostra e construção da curva de calibração, é de 30 minutos, o que é incompatível com a alta produção e demanda pelo controle deste parâmetro³⁶.

A cromatografia a líquido de alta eficiência foi também utilizada para a determinação de glicerol livre em biodiesel⁹. Entre as vantagens desta técnica em relação à CG destaca-se a não necessidade de derivatização química do analito e utilização de fase móvel aquosa. Neste procedimento não são gerados resíduos tóxicos, porém a extração do analito da fase orgânica (biodiesel) para uma fase aquosa é necessária. Embora o pico referente ao analito seja identificado no cromatograma em menos de 2 minutos, a etapa de extração demora 2,5 h, tornando o procedimento incompatível com a demanda de análises para o monitoramento do produto. O custo e a manutenção do equipamento são também elevados.

Tabela 1: Características analíticas de alguns procedimentos para a determinação de glicerol livre em biodiesel.

Procedimento	Observações	Faixa linear (mg kg ⁻¹)	Limite de detecção (mg kg ⁻¹)	Referência
Espectrofotométrico	Extração líquido-líquido (hexano), etapas mecanizadas	80 - 600	-	16
Espectrofotométrico	Extração em fase sólida, uso de hexano	40 - 4000	-	37
Espectrofotométrico em fluxo	Extração líquido-líquido (água), etapas mecanizadas.	25 - 350	4,0	38
Cromatografia a gás	Derivatização química do analito, uso de solventes tóxicos (piridina)	50 - 5000	-	34, 35
Cromatografia líquida	4-20 g de amostra por determinação. Processo de extração por 2 horas	-	4,0	9
Cromatografia de íons	Processo de extração e reação de saponificação	5 - 1000	0,7	39
Eletroforese Capilar	Extração com água e clorofórmio, uso de centrífuga	12 - 82	4,3	15
Voltamétrico	Extração líquido-líquido (água e acetona) purificação em coluna C ₁₈	56 - 560	2,3	14

A cromatografia de íons também foi explorada para a caracterização de amostras de biodiesel³⁹. Apesar do trabalho apresentar um baixo limite de detecção ($0,7 \text{ mg kg}^{-1}$), o procedimento proposto envolve extração do analito e reação de saponificação para a quantificação de glicerol livre e total, respectivamente.

Alternativas aos métodos cromatográficos vêm sendo estudadas para a determinação de glicerol livre em biodiesel. Bondioli e Della Bella¹⁶ apresentaram um procedimento baseado na oxidação do glicerol por periodato, produzindo formaldeído, seguido da reação com acetilacetona (2,4-pentadionona) e posterior monitoramento do produto por espectrofotometria em 410 nm. Esta última reação trata de uma adaptação de procedimentos usuais para a determinação fluorimétrica e/ou espectrofotométrica de formaldeído, largamente empregados para análises de amostras ambientais⁴⁰⁻⁴³, bebidas^{44, 45} e outros biocombustíveis, como etanol⁴⁶. Devido à etapa de aquecimento durante a reação com acetilacetona, este procedimento requer controle preciso de temperatura a 70°C . No preparo da amostra são empregados 4,0 mL de hexano por determinação, agitação mecânica por *vortex* e centrifugação para a extração líquido-líquido. Embora seja uma alternativa mais viável dos pontos de vista econômico e prático, este procedimento gera uma grande quantidade de resíduos tóxicos e, devido ao tempo consumido durante o preparo de amostras (30 minutos), não é rápido o suficiente para acompanhar a demanda durante a produção e plausível para a análise *in situ*.

A reação de oxidação do glicerol livre em amostras de biodiesel empregando o metaperiodato também foi utilizada no procedimento proposto por Gonçalves e Micke¹⁵. Entretanto, neste trabalho, os autores monitoravam o iodato formado na reação por eletroforese capilar. Embora o procedimento apresente características

analíticas satisfatórias, etapas de extração e centrifugação são necessárias, o que inviabiliza a determinação *in situ*.

Técnicas eletroanalíticas também foram utilizadas para a determinação de glicerol em biodiesel, como no trabalho proposto por Lourenço e Stradiotto¹⁴. Embora o procedimento tenha baixo custo operacional, a etapa de preparo da amostra é trabalhosa e envolve extração utilizando uma coluna com sílica funcionalizada C₁₈ para eliminação do metanol residual e evaporação do solvente a vácuo (200 mmHg) por 7 minutos a 80°C, o que resulta em baixa frequência analítica. O eletrodo de trabalho deve ser regenerado periodicamente, o que requer polimento com alumina com diâmetro de partícula da ordem de 0,3 µm, lavagem com água deionizada e ativação através de 50 voltamogramas consecutivos entre -1,4 e 1,3 V em uma solução de HClO₄ 100 mmol L⁻¹ a uma taxa de 100 mV s⁻¹.

Um procedimento prático para a determinação de metanol e glicerol livre em biodiesel, sem a necessidade de preparo de amostra, utiliza medidas espectrofotométricas nas regiões do infravermelho próximo e visível⁴⁷. Apesar do trabalho apresentar um bom desempenho para a quantificação de metanol, os resultados apresentados para glicerol livre apresentam baixa exatidão, evidenciado pelo baixo coeficiente de correlação ($r^2 = 0,8097$) apresentado na análise comparativa descrita no trabalho.

1.3. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um procedimento analítico rápido, simples e de baixo custo para a quantificação de glicerol livre em biodiesel visando o monitoramento *in situ*. Os objetivos específicos foram:

1. Desenvolver um procedimento analítico requerendo instrumentação portátil e de baixo custo;
2. Evitar a etapa de extração líquido-líquido do analito e, conseqüentemente, o uso de solventes orgânicos tóxicos e a separação de fases;
3. Simplificar o procedimento de derivação do analito, reduzindo as etapas de processamento da amostra e o tempo de análise;
4. Minimizar as quantidades de reagentes e a geração de resíduos.

2

Parte Experimental

2. Parte Experimental

2.1. Equipamentos e acessórios

Para as medidas de absorbância foi empregado um espectrofotômetro monocanal (Femto 600 plus). Um espectrofotômetro multicanal com arranjo linear de 2048 fotodetectores do tipo CCD (charge-coupled devices, Ocean Optics), conectado a um microcomputador através de uma porta USB, foi utilizado para obter espectros de absorção e para o monitoramento do sinal analítico em função do tempo. Cabos de fibra óptica foram empregados para conduzir a radiação emitida pela lâmpada de tungstênio–halogênio (Ocean Optics, LS-1) até a cela de medida equipada com cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,00 cm, e da saída desta até o sistema de detecção. O software utilizado para a aquisição de dados foi o OOIBase32, fornecido pelo fabricante do espectrofotômetro multicanal.

Para a extração de glicerol do biocombustível foi empregado um agitador mecânico do tipo *vortex* (Quimis). Uma centrífuga para tubos (Quimis) foi utilizada para acelerar o processo de separação de fases. Um pHmetro (Metrohm), banho-maria com controle de temperatura (Quimis) e tubos de polipropileno (15 mL) com tampa de rosca também foram utilizados.

2.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada e/ou etanol anidro com pureza mínima de 99,8% e reagentes de grau analítico. Soluções de referência de 2,0 a 40,0 mg L⁻¹ de glicerol foram preparadas em meio de etanol por diluições sucessivas de uma solução estoque 10,0 g L⁻¹, preparada a partir de padrão de pureza superior a 99%, por dissolução em água deionizada.

Solução estoque de ácido acético $1,6 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diluindo 50,0 mL de ácido glacial (99,7% de pureza) em 500,0 mL de água deionizada. Para a solução estoque de acetato de amônio $4,0 \text{ mol L}^{-1}$, 77,0 g do sal foi dissolvido em 250,0 mL de água deionizada. Estas duas soluções, quando misturadas na proporção volumétrica 1:1, resultam em uma solução tampão de pH 5,5. Durante as etapas de otimização, soluções de metaperiodato de potássio (Fluka) em concentrações de 1,0 a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foram preparadas pela dissolução em ácido acético e posterior adição de acetato de amônio. As soluções de acetilacetona, com concentrações de 0,01 a $1,00 \text{ mol L}^{-1}$, foram preparadas pela diluição direta do reagente (Sigma) em tampão ácido acético/acetato de amônio. O pH das soluções dos reagentes foi ajustado com ácido acético entre 5,0 e 5,5, adequado para as reações de oxidação do glicerol e de formação do produto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina⁴⁸.

Os efeitos das concentrações dos reagentes, bem como tempo e temperatura de reação, foram avaliados através do método univariado. A otimização foi realizada a fim de obter a máxima sensibilidade e minimizar o sinal do branco, o consumo de reagentes e o tempo de análise.

2.3. Estratégias para o preparo de amostras

Para facilitar a extração do glicerol livre, aumentando a diferença de densidade entre a fase orgânica (biodiesel) e a fase aquosa, soluções de sais inorgânicos (cloretos e nitratos de sódio e de potássio) a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foram utilizadas como solução extratora. Os ensaios foram conduzidos empregando 1,00 g de biodiesel e 4,0 mL das soluções extratoras, misturados em tubos de polipropileno e fechados com tampa com rosca. As misturas foram agitadas vigorosamente por 10 segundos e então mantidas em repouso para a separação das fases.

Soluções extratoras preparadas pela mistura de etanol e água também foram avaliadas. Em tubos de ensaio foram adicionados 1,00 g de biodiesel e 4,0 mL de soluções contendo 0, 25, 50, 75 e 99,8% de etanol. Os tubos foram agitados manualmente, mantidos em repouso por 30 minutos e alíquotas de 0,5 mL da fase aquo-etanólica foram analisadas. Nestas alíquotas foram adicionados 0,5 mL de periodato de potássio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$; 2,0 mL de acetilacetona $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e a mistura foi aquecida a 70°C durante 1 minuto. Após completa reação, uma alíquota de 5,0 mL de etanol anidro foi adicionada à mistura para garantir a formação de uma única fase.

2.4. Estudos cinéticos

2.4.1. Condições do meio para a formação da 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina

As reações de oxidação do glicerol e de Hantzsch para a formação da 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina foram avaliadas em meio aquoetanólico. Solução de glicerol 20 mg L^{-1} foi preparada em meio de etanol anidro. Diretamente, em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm, 0,5 mL da solução de glicerol foi misturada com os reagentes preparados em tampão pH 5,5. Inicialmente, foi adicionado 0,5 mL de KIO_4 $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e, após 5 minutos de reação, 2,0 mL da solução de acetilacetona $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionado, a mistura foi homogeneizada rapidamente e a absorbância foi monitorada em 410 nm por uma hora.

Para verificar a influência do meio reacional, sobre a velocidade da reação, experimentos foram conduzidos em meios aquoso e etanólico. Para as reações em meio aquoso, todos os reagentes foram preparados em tampão ácido acético / acetato de amônio. Foram empregados 0,5 mL de glicerol 40 mg L^{-1} , 0,5 mL de KIO_4 5 mmol L^{-1} e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de acetilacetona. Uma alíquota de 2,0 mL de tampão foi

adicionada ao final, a mistura foi homogeneizada e a absorbância foi monitorada em 410 nm.

No estudo em meio predominantemente etanólico, solução contendo 40 mg L⁻¹ de glicerol foi preparada em etanol anidro. A solução de KIO₄ foi preparada com 12,5 mg do sal em 1,0 mL de ácido acético 1,6 mol L⁻¹, sob agitação mecânica durante 20 minutos, com posterior adição de 1,0 mL da solução de acetato de amônio 4,0 mol L⁻¹. Esta mistura foi agitada por 20 minutos e uma alíquota de 8 mL de etanol anidro foi adicionada ao final. A solução de acetilacetona foi preparada diluindo 1,0 mL do reagente em 1,0 mL de acetato de amônio 4,0 mol L⁻¹ e 1,0 mL de ácido acético 1,6 mol L⁻¹. Esta mistura foi mantida sob agitação por 10 minutos e em seguida foi adicionado 7,0 mL de etanol anidro. Os reagentes foram misturados em cubeta com caminho óptico de 1,0 cm. Uma alíquota de 2,0 mL de etanol anidro foi adicionada ao final, a mistura foi homogeneizada e a absorbância foi monitorada em 410 nm.

2.4.2. Formação do reagente *fluoral P*

Na literatura diversos estudos relatam a formação do *fluoral P*, um precursor para a reação de Hantzsch^{46, 49-52}. A estabilidade e a formação deste reagente foi cuidadosamente avaliada. Para este experimento foi preparada uma solução de acetilacetona 0,5 mol L⁻¹ em meio tampão de ácido acético 0,8 mol L⁻¹ / acetato de amônio 2,0 mol L⁻¹ (pH 5,1). Os reagentes foram misturados diretamente em cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico. A absorbância foi monitorada em 410 nm por duas horas à temperatura ambiente (ca. 23°C).

2.5. Procedimento para a determinação de glicerol livre em biodiesel empregando sistema de fase única para análise *in situ*.

O diagrama de blocos da Figura 1 apresenta as etapas envolvidas no procedimento analítico proposto para a determinação de glicerol em sistema em fase única.

Figura 1: Diagrama das etapas envolvidas no procedimento proposto para a determinação de glicerol livre em biodiesel em sistema de fase única

As amostras de biodiesel foram pesadas (ca. 1,0 g), diluídas 10 vezes com etanol anidro e homogeneizadas por agitação manual. Alíquotas desta mistura (500 µL) foram transferidas para tubos de polipropileno com tampa. A solução de metaperiodato de potássio 5,0 mmol L⁻¹ foi adicionada (200 µL) e, após 2 minutos, foram adicionados 500 µL da solução de acetilacetona 0,2 mol L⁻¹. O tubo foi

fechado e agitado manualmente. A mistura foi aquecida a $50,0 \pm 0,1$ °C por 10 min. Após a reação, a solução foi resfriada em béquer com água, a temperatura ambiente, por ca. 1 minuto. Alíquota de 3,5 mL de etanol anidro foi adicionada ao final do processo para a formação de uma única fase. A mistura foi então homogeneizada e a absorbância medida em 410 nm.

A quantificação foi realizada através do método das adições de analito. Para isto, foram adicionadas alíquotas de 100 µL de soluções estoque 10 ou 20 mg L⁻¹ de glicerol, preparadas em etanol anidro. Para compensar o efeito da absorção da radiação devido aos concomitantes na amostra, também foi realizado um ensaio sem a adição da solução de metaperiodato de potássio, substituída por igual volume da solução tampão.

2.6. Procedimento de referência

O procedimento espectrofotométrico para a determinação de glicerol livre em biodiesel, proposto por Bondioli e Della Bela¹⁶, foi utilizado como referência. As amostras foram pesadas (ca. 1,00 g) em tubo de polipropileno (15,0 mL) e diluídas com 4,0 mL de hexano. Solução etanol/água (1:1) foi adicionada (4,0 mL) para extração do analito. A mistura foi agitada mecanicamente em *vortex*, durante 5 minutos. Para acelerar o processo de separação de fases, uma centrífuga foi empregada por 15 minutos a 2000 rpm. Após a centrifugação, a fase orgânica foi removida e alíquota de 0,5 mL da fase aquo-etanólica foi transferida para um tubo de ensaio e diluída com adição de 1,5 mL da solução etanol/água (1:1). Para a oxidação do glicerol foram adicionados 1,2 mL de solução de KIO₄ 10 mmol L⁻¹, preparada em acetato de amônio 2,0 mol L⁻¹, pH 5,5. A mistura foi agitada manualmente por 30 segundos e subsequentemente foram adicionados 1,2 mL de

uma solução de acetilacetona $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, preparada em tampão ácido acético $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ / acetato de amônio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. A mistura foi posteriormente aquecida a 70°C durante 1,0 minuto. Após reação, a mistura foi rapidamente resfriada em água corrente até temperatura ambiente, seguida da medida espectrofotométrica em 410 nm.

3

Resultados e Discussões

3. Resultados e discussões

O procedimento em fase única surgiu da avaliação de estratégias para extração do analito, visando evitar o uso de solventes tóxicos, como o hexano. Soluções salinas em meio aquoso ou soluções formadas por diferentes proporções entre etanol e água foram avaliadas. Desta maneira, buscou-se uma alternativa para evitar a utilização de equipamentos de agitação mecânica¹⁶, de centrifugação^{38, 48}, de extratores à vácuo⁹ ou técnicas de separação^{14, 39}, durante o preparo das amostras.

A determinação de glicerol livre em biodiesel foi baseada na oxidação do analito a formaldeído pelos íons IO_4^- (Figura 2). O formaldeído gerado reage com acetilacetona, em meio amoniacal, formando o composto de cor amarela, 3,5-diacetil-1,4-dihidrotutidina (Figura 3), que pode ser medido por espectrofotometria.

Figura 2: Esquema da reação de oxidação do glicerol por periodato de potássio.

Figura 3: Esquema da reação entre o formaldeído e a acetilacetona em meio amoniacal.

Os espectros de absorção dos reagentes, do produto da reação e da amostra de biodiesel foram obtidos a fim de avaliar o melhor comprimento de onda para medida. O composto 3,5-diacetil-1,4-dihidrotutidina possui máximo de absorção em 410 nm⁵³. A acetilacetona em meio amoniacal forma um precursor para a reação de Hantzsch, chamado de *fluoral P*^{51, 52}. Este composto também apresenta cor amarela (Figura 4b) e pode interferir nas medidas analíticas. Estudos cinéticos também foram realizados para melhor entendimento da formação deste precursor e do produto da reação. Por fim, o procedimento em fase única foi otimizado e as características analíticas do procedimento para a determinação de glicerol livre em biodiesel foram avaliadas.

Figura 4: Espectros de absorção da (a) 3,5-diacetil-1,4-dihidrotutidina e (b) branco.

As reações apresentadas nas equações das figuras 2 e 3 foram realizadas experimentalmente na sequência descrita a partir de um padrão de glicerol preparado em meio aquoso. O máximo de absorção foi coincidente com o relatado em trabalhos da literatura^{16, 48} (410 nm) para determinação de glicerol em biodiesel.

3.1. Estudos preliminares

3.1.1. Extração

Todos os procedimentos descritos na literatura para a quantificação de glicerol livre em biodiesel, exceto o preconizado pela ANP^{7, 35}, empregam etapas de extração líquido-líquido¹⁶ ou em fase sólida³⁷. No procedimento espectrofotométrico descrito na literatura¹⁶ é necessária uma etapa de extração do analito utilizando 4,0 mL de solução 50% (v/v) etanol/água e 4,0 mL de hexano. Embora o procedimento proposto pelos autores seja uma boa alternativa ao método preconizado pelos órgãos regulatórios^{7, 34}, as etapas de agitação por *vortex* e de centrifugação demandam, no mínimo, 25 minutos e utiliza-se solvente tóxico. Esses fatores dificultam a execução *in situ*. Assim, alternativas foram estudadas para favorecer a separação entre as fases visando evitar o uso de solventes orgânicos tóxicos e etapas que exigem equipamentos para o preparo de amostras, tornando o procedimento mais limpo, rápido e viável para análises em campo.

Segundo as especificações da ANP, a densidade do biodiesel pode variar entre 0,85 a 0,90 g mL⁻¹. Desta forma, diversos ensaios utilizando soluções salinas em meio aquoso (cloretos e nitratos de sódio e potássio), foram feitos para elevar a diferença de densidade entre as fases e, assim, favorecer a separação, evitando a necessidade de centrifugação. Apesar de ocorrer a separação, após a mistura e agitação, a fase aquosa persistia turva mesmo após 30 minutos de repouso, devido à formação de emulsão, tornando-se límpida somente 1 a 2 horas depois. Vale ressaltar que emulsões são indesejadas para medidas espectrofotométricas, pois promovem o espalhamento da radiação gerando dados errôneos⁵⁴. Uma vez que se almeja um procedimento para análises *in situ*, esta estratégia foi considerada inviável, em razão do longo tempo para a efetiva separação das fases.

Soluções contendo 0, 25, 50, 75 e 99,8% de etanol também foram utilizadas para avaliar o processo de extração de glicerol livre em biodiesel. Nos experimentos, 4 das 5 soluções extratoras, a fase polar ainda mantinha aspecto ligeiramente turvo. A única solução que obteve aspecto límpido foi a tratada com etanol anidro, pois não houve a separação de fases e sim uma diluição da amostra em meio alcoólico. Neste caso, após a adição dos reagentes em solução aquosa, foi observada turvação devido à insolubilidade do biodiesel remanescente em solução. Esse inconveniente foi superado com a adição de 5,0 mL de etanol anidro após a formação do produto, tornando o biodiesel remanescente miscível e garantindo a formação de uma única fase. A Figura 5 apresenta os sinais de absorbância em função da porcentagem de etanol empregada na extração.

Figura 5: Efeito da porcentagem de etanol sobre o sinal analítico (a) e do branco (b) para o processo de extração de glicerol livre em amostra de biodiesel. As concentrações finais foram $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ metaperiodato de potássio e $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ acetilacetona.

Nos casos dos ensaios empregando soluções extratoras contendo entre 0 e 75% de etanol, a fase orgânica foi descartada e a resposta devido ao glicerol presente na amostra foi medida na fase aquo-etanólica. Os maiores valores de

sinais analíticos foram obtidos com soluções contendo 25 e 50% de etanol. Entretanto, a amostra que recebeu apenas etanol anidro (volume final de 5,0 mL) foi diluída em *ca.* 20% em relação aos demais extratos (volume de 4,0 mL), devido à formação de uma única fase. A razão observada entre os sinais analíticos obtidos para estas soluções e aquela diluída em etanol evidenciou que a resposta analítica foi proporcional à diluição para a amostra que recebeu etanol anidro.

A formação de um sistema de fase única, obtida quando o etanol anidro foi utilizado para diluir o biodiesel, tornou o procedimento mais rápido e evitou perdas de analito por extração incompleta. Portanto, a possibilidade de desenvolver um procedimento analítico sem a necessidade de extração, realizando a análise em meio alcoólico ao invés do meio aquoso, foi investigada nos estudos subsequentes.

3.1.2. Estudos cinéticos

3.1.2.1. Estudo cinético para a formação do fluoral P em meio amoniacal

Um estudo cinético foi realizado para avaliar a formação do precursor *fluoral P*, sendo os resultados apresentados na Figura 6.

Figura 6: Estudo cinético da formação do reagent fluoral P em meio de tampão ácido acético/acetato de amônio e pH = 5,5.

O aumento do valor de absorbância nos 15 minutos iniciais foi significativo, indicando que a reação de formação do *fluoral P* se desenvolveu de forma apreciável neste intervalo. Após isto, a velocidade da reação diminuiu e o sinal aumentou de forma constante, por ca. 1,5 h. O estado estacionário foi atingido somente após 110 minutos da adição e mistura dos reagentes, devido à baixa concentração de amônia livre ($pK_{a(NH_4)} = 9,24$)⁵⁵ no tampão ácido acético/acetato de amônio (pH 5,1). Diversos trabalhos na literatura^{16, 38, 48} utilizam elevadas concentrações de acetato de amônio para que haja amônia suficiente para reagir com a acetilacetona e formar o precursor da reação de Hantzsch. Além disto, nenhum destes trabalhos descreve os cuidados quanto à necessidade do tempo mínimo de preparo para que o equilíbrio seja alcançado. É importante salientar que o incremento de absorbância devido à absorção pelo reagente pode afetar a exatidão do procedimento. Por este motivo, as reações foram realizadas após a completa formação deste precursor, sendo a solução de acetilacetona em meio tamponado preparada com no mínimo 2 horas de antecedência.

A estabilidade deste reagente foi avaliada realizando medidas de absorbância, em 410 nm, de uma solução de acetilacetona 0,2 mol L⁻¹, durante 20 dias, três vezes por semana. O coeficiente de variação foi estimado em 1,5% para o período avaliado.

3.1.2.2. Formação de produto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina

Na literatura, trabalhos para determinação de glicerol em biodiesel já foram propostos utilizando a reação com acetilacetona à temperatura ambiente^{38, 48}. Estudos cinéticos mostraram que a reação do formaldeído com a acetilacetona

ocorre rapidamente durante os primeiros 7 minutos⁴⁸ e após isto, houve um período no qual a reação, aparentemente, chegou ao estado estacionário; entretanto, o sinal analítico voltou a aumentar após 20 minutos, provavelmente devido à formação de outro produto reacional. Nesse experimento, uma elevada concentração de acetilacetona foi empregada, o que aumenta a velocidade de formação dos produtos. Além disto, as reações ocorreram em meio aquoso, o que implica a necessidade de extração do analito.

Visando evitar etapas de aquecimento e tornar o procedimento mais simples para análise em campo, a formação da 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina em temperatura ambiente foi avaliada, Figura 7. Devido à proposta de diluição da amostra em meio alcoólico a solução de glicerol foi preparada em meio de etanol anidro.

Figura 7: Estudo cinético da reação de formação do 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (a) e variação do sinal de branco (b) em meio aquo-etanólico. As concentrações finais dos reagentes utilizados foram: 3,33 mg L⁻¹ de glicerol, 0,8 mmol L⁻¹ de KIO₄ e 0,3 mol L⁻¹ de acetilacetona.

Diferentemente dos resultados descritos na literatura⁴⁸, o experimento realizado não indicou que o estado estacionário foi alcançado ca. 7 minutos após adição dos reagentes, sendo observado que a formação do produto não cessou em

período inferior a 1 hora. Tal efeito foi atribuído à presença de etanol no meio reacional, o qual pode ter afetado a velocidade da reação.

Para verificar a influencia do meio sobre a reação, estudos cinéticos para a formação da 3,5-diacetil-1,4-dihifrolutidina foram realizados em meio aquoso e em meio alcoólico. A Figura 8 apresenta a formação do produto reacional através do monitoramento da absorbância, em 410 nm, em função do tempo.

Figura 8: Estudo cinético da reação de formação da 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina em meio (a) etanólico e (b) aquoso, contendo $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ glicerol, $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ KIO_4 e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ acetilacetona.

Nas condições avaliadas, os resultados obtidos apontaram que a reação em meio aquoso, inicialmente, ocorreu mais rápido que em meio etanólico. Entretanto, a condição de equilíbrio não foi alcançada mesmo após 35 minutos de reação à temperatura ambiente em ambos os meios. Almeja-se que os procedimentos para análises *in situ* sejam rápidos. Assim, tempos superiores a 30 minutos para atingir o estado estacionário são considerados longos e inviáveis para medidas *in loco*. Desta forma, para que o estado estacionário da reação seja alcançado, uma etapa de aquecimento foi avaliada e proposta para a análise *in situ*.

3.1.3. Ordem de adição dos reagentes

A ordem de adição dos reagentes, bem como o uso de um reagente único, formado pela mistura de metaperiodato de potássio e acetilacetona, foi avaliada.

Uma das estratégias foi diluir a amostra de biodiesel em uma mistura de etanol e acetilacetona, com posterior adição do oxidante. Entretanto, a reação do formaldeído para a formação do produto reacional não é diretamente com a acetilacetona e sim com um precursor formado por este reagente e amônia livre em solução. Desta maneira, mesmo após 10 minutos de aquecimento a 70°C, não foi observada formação de quantidade significativa do produto reacional.

Solução contendo metaperiodato de potássio e acetilacetona em acetato de amônio com pH 5,5 também foi avaliada. Em uma alíquota de 0,5 mL de biodiesel diluído em etanol foi adicionado 2,0 mL do reagente, a mistura foi aquecida por 1 minuto a 70°C. As fases foram separadas com auxílio de uma centrífuga e a absorbância foi medida em 410 nm. Neste estudo não foram verificadas diferenças significativas entre os resultados obtidos na ausência e presença do oxidante, também devido à necessidade de formação prévia do precursor *fluoral P*. Portanto, a estratégia de utilizar única solução contendo metaperiodato e acetilacetona foi descartada.

Respostas significativas foram alcançadas adicionando primeiramente à amostra a solução de metaperiodato de potássio, seguida de homogeneização. Após a formação dos produtos da oxidação do analito, a solução de *fluoral P* deve ser adicionada para a formação do produto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina.

3.1.4. *Diluição da amostra*

A diluição da amostra, na etapa inicial do procedimento, também foi avaliada. Com o intuito de evitar a adição dos 3,5 mL de etanol ao final do processo, foi investigada uma diluição inicial de 80 vezes da amostra, ao invés de 10 vezes, como descrito nos estudos anteriores. Esse estudo foi realizado com três amostras de biodiesel. A diluição foi calculada para que ao final de ambos os experimentos as soluções contivessem o mesmo volume final e a mesma concentração de biodiesel e de todos os reagentes. O tempo de reação para a oxidação, bem como a temperatura e tempo de reação com a acetilacetona, foram rigorosamente controlados.

Os resultados para este experimento evidenciaram que o procedimento no qual a diluição foi realizada ao final do processo, apresentou maior sinal analítico, enquanto no experimento empregando 4,0 mL de amostra diluída a diferença de absorbância entre os sinais analítico e do branco foi ca. 10% do observado no outro procedimento. Tal efeito foi atribuído à baixa solubilidade do metaperiodato no meio reacional devido ao alto teor de etanol (> 75%). Em meio aquoso, a solubilidade do KIO_4 é de $4,2 \text{ g L}^{-1}$ a 20°C ⁵⁶, mas o reagente é muito pouco solúvel em etanol. Desta forma, a velocidade de reação foi comprometida devido à baixa concentração do oxidante em solução. Portanto, a diluição realizada ao final do procedimento com etanol anidro foi mantida.

3.2. Otimização

A fim de se obter a máxima sensibilidade para a determinação de glicerol livre em biodiesel, a influência de diversos parâmetros sobre o sinal analítico foi avaliada. O monitoramento foi realizado no comprimento de onda de máxima absorção da 3,5-diacetil-1,4-dihidrotutidina (410 nm).

Para avaliar o efeito da concentração dos reagentes sobre o sinal analítico, as faixas escolhidas para as concentrações de metaperiodato de potássio e acetilacetona foram 1,0 - 10,0 mmol L⁻¹ e 0,05 - 1,00 mol L⁻¹, respectivamente. Em todos os estudos, o pH das soluções dos reagentes foi ajustado entre 5,0 e 5,5, que corresponde ao intervalo que apresenta melhor condição para as reações, segundo estudos relatados na literatura⁴⁸. Os efeitos da temperatura e do tempo necessário para cada etapa da reação também foram avaliados.

3.2.1. Oxidação do glicerol

Para determinar o tempo mínimo necessário para a oxidação do glicerol a formaldeído, estudo cinético foi realizado. Para isto, utilizou-se 0,5 mL de uma solução contendo 20 mg L⁻¹ de glicerol, preparada em meio etanólico. Após oxidação, a solução de acetilacetona foi adicionada em todos os tubos, mantidos em repouso por 10 minutos antes das medidas espectrofotométricas.

Tabela 2: Variação dos sinais analíticos e branco com o tempo de oxidação do glicerol pelo metaperiodato de potássio.

Tempo de oxidação (min)	Absorbância	
	<i>branco</i>	<i>glicerol</i>
1,8	0,033 ± 0,001	0,149 ± 0,001
2,7	0,033 ± 0,001	0,148 ± 0,001
3,5	0,033 ± 0,001	0,153 ± 0,001
4,3	0,034 ± 0,001	0,154 ± 0,001

Para o intervalo de tempo avaliado (Tabela 2) não foram observadas diferenças significativas no sinal analítico. Desta forma, foi estabelecido que a etapa de oxidação do analito deverá ser realizada em 2 minutos, compatível com procedimentos realizados em campo.

O efeito da concentração de metaperiodato de potássio foi avaliado entre 0,1 e 10 mmol L⁻¹ e a influencia sobre o sinal analítico é apresentada na Figura 9.

Figura 9: Efeito da concentração de metaperiodato de potássio sobre o sinal de (a) 1,67 mg L⁻¹ glicerol e (b) branco. Reagente 0,2 mol L⁻¹ acetilacetona.

De acordo com a Figura 9, houve aumento significativo do sinal analítico com a concentração de KIO₄ até 3,0 mmol L⁻¹. Acima deste valor, não foram observadas diferenças significativas do sinal analítico pois, nestas condições, de acordo com a estequiometria da reação, há um excesso de 11 vezes do oxidante em relação à concentração máxima de glicerol (0,02% m/m) permitida pela legislação vigente. Visando aumentar a robustez do procedimento, os estudos posteriores foram realizados com solução de KIO₄ 5,0 mmol L⁻¹. Isto garante que o metaperiodato de potássio não seja o reagente limitante da reação. Mesmo assim, a quantidade deste

reagente empregado é ca. 14 vezes menor do que o procedimento espectrofotométrico proposto na literatura¹⁶.

3.2.2. Reação de Hantzsch

O efeito da temperatura em função do tempo de reação para a formação da 3,5-diacetil-1,4-dihidrotutidina também foi avaliado. Embora a reação entre o formaldeído e o *fluoral P* ocorra à temperatura ambiente, a utilização de uma etapa de aquecimento aumenta a velocidade da formação do produto, tornando o procedimento mais rápido e compatível com medidas em campo. Para tanto, foi avaliado aquecimento em banho de água com temperatura precisamente controlada. O tempo necessário para a reação alcançar o equilíbrio foi avaliado nas temperaturas de 24,5 (ambiente), 40 e 50°C. Para cada temperatura foram realizadas 6 medidas de absorbância em intervalos de 5 minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A diluição, utilizando 3,5 mL de etanol anidro, foi realizada após resfriamento até a temperatura ambiente.

Como observado em estudos anteriores, a reação de formação da 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina é lenta e não atinge o estado estacionário após 30 min de reação à temperatura ambiente (Figura 10). Utilizando um banho com temperatura controlada em $(40,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$, houve uma tendência de equilíbrio após 15 minutos de reação e um ganho de sensibilidade na ordem de duas vezes em relação aos estudos realizados à temperatura ambiente. No estudo mantendo os tubos a $(50,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$, o equilíbrio foi rapidamente alcançado (5 minutos de reação). Portanto, o aquecimento a 50°C foi empregado nos estudos subsequentes.

Figura 10: Estudo cinético da reação entre formaldeído e *fluoral P* (a) 24, (b) 40 e (c) 50°C.

Reagentes utilizados: 2,0 mg L⁻¹ glicerol, 0,2 mmol L⁻¹ KIO₄ e 0,2 mol L⁻¹ acetilacetona.

No experimento realizado a 50°C, o sinal do branco aumentou com o decorrer do tempo de reação, ca. 20% entre 5 e 30 min de reação. Provavelmente este efeito se deve à reação entre a acetilacetona, em excesso, com o etanol⁵⁷, formando outro produto que absorve no comprimento de onda de medida.

A concentração de acetilacetona foi avaliada entre 0,05 e 1,00 mol L⁻¹ e a influência sobre o sinal analítico é apresentada na Figura 11. Aquecimento a 50°C por 10 minutos foi empregado para acelerar a reação. Não foi verificada variação significativa do sinal analítico com concentrações de acetilacetona acima de 0,10 mol L⁻¹ pois, nesta concentração, há excesso do precursor da reação (ca. 230 vezes), suficientemente para reagir com todo formaldeído gerado a partir da oxidação do glicerol. Entretanto, foi verificado aumento significativo do sinal do branco, decorrente do aumento da concentração de acetilacetona e, conseqüentemente, *fluoral P*, que absorve no comprimento de onda de medida, como discutido anteriormente.

Figura 11: Efeito da concentração de acetilacetona sobre os sinais (a) analítico e (b) branco.

Temperatura de reação 50°C. Reagentes utilizados 0,5 mmol L⁻¹ KIO₄ e 2,0 mg L⁻¹ de glicerol.

A diferença entre os sinais analítico e do branco (sinal líquido) diminui com o aumento da concentração de acetilacetona. Desta forma, o uso de concentrações superiores a 0,3 mol L⁻¹, prejudicaria a sensibilidade do procedimento. Portanto, a concentração que proporcionou a maior diferença entre o sinal analítico e o sinal do branco (0,2 mol L⁻¹) foi selecionada para os estudos subsequentes. Esta concentração é ca. 1,5 vezes menor que a empregada no trabalho apresentado por Bondioli e Della Bella¹⁶.

3.2.3. Efeito da temperatura e do tempo para as reações em meio da amostra

Uma amostra de biodiesel, oriunda de óleo de mamona, foi utilizada para avaliar se as condições reacionais empregando soluções sintéticas de glicerol em meio etanólico seriam adequadas para amostras diluídas em etanol anidro. O estudo foi realizado variando o tempo de aquecimento das soluções com temperatura controlada a 50,0°C durante 5, 10 e 30 minutos (Tabela 3). Para a medida do branco, o metaperiodato de potássio foi substituído pelo tampão no qual foi preparado, evitando-se assim a oxidação do glicerol a formaldeído.

Tabela 3: Sinais analíticos obtidos variando o tempo de reação sob aquecimento a 50°C para uma amostra de biodiesel.

Tempo (min)	Absorbância	
	Branco	Glicerol
5	0,023 ± 0,001	0,423 ± 0,004
10	0,026 ± 0,001	0,444 ± 0,010
30	0,037 ± 0,001	0,453 ± 0,003

De acordo com os dados na Tabela 3, houve um pequeno aumento do sinal analítico entre 5 e 10 minutos de aquecimento. Já para as soluções com 10 e 30 minutos de reação a 50°C, observou-se aumento, proporcional no sinal analítico e do branco. Analisando o sinal líquido, não foram observadas diferenças significativas em nível de confiança de 95% entre 10 e 30 minutos de reação a 50°C. Portanto, o tempo de 10 minutos foi escolhido para os estudos subsequentes.

Embora a velocidade da reação para formação do produto seja favorecida pelo aquecimento, a permanência demasiada da mistura sob aquecimento pode gerar reações indesejadas. Tri, di e mono-glicerídeos, não reagidos durante o processo de produção de biodiesel (transesterificação), na presença de etanol em meio ácido a 50°C, podem formar alquilésteres e glicerol, o qual pode ser oxidado pelo excesso de metaperiodato de potássio no meio. O formaldeído gerado pode reagir com *fluoral P*, justificando o aumento do sinal do branco.

3.2.4. Efeito da quantidade de etanol para a formação de uma única fase

Nos primeiros testes utilizando amostras foi observado que a água proveniente dos reagentes tornava o biodiesel imiscível, deixando a mistura com aspecto turvo. Nestas condições, as medidas espectrofotométricas são prejudicadas devido ao espalhamento de radiação.

O efeito do teor alcoólico para garantir a formação de uma única fase foi avaliado. Amostras de biodiesel oriundas de diferentes matérias-primas foram empregadas. O experimento foi conduzido utilizando 0,2 mL de metaperiodato de potássio 5 mmol L^{-1} e 0,5 mL de amostra diluída 10 vezes em etanol anidro, seguida da adição de 0,5 mL de acetilacetona $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Sob estas condições, a quantidade de etanol necessária para formar uma única fase, após a reação, foi avaliada pela adição sucessiva de pequenos volumes de etanol anidro com auxílio de uma bureta. A Tabela 4 apresenta os volumes de etanol empregados para cada amostra até a formação de uma única fase límpida.

Tabela 4: Quantidade de etanol necessária para a formação de uma única fase no procedimento para a quantificação de glicerol em diferentes amostras de biodiesel.

<i>Amostra</i>	<i>Etanol adicionado (mL)</i>	<i>Etanol em solução (%)</i>
OGR I*	> 10,0	94
SOJA I	3,5	85
SOJA II	6,5	91
ALGODÃO I	3,5	85
MAMONA I	2,0	78
MAMONA II	2,5	81
FRITURA I	> 10,0	94
SEBO BOVINO I	3,8	86

**óleos e gorduras residuais*

As amostras de óleos e gorduras residuais (OGR) e fritura apresentaram aspecto turvo mesmo com elevados teores de etanol (>90%). As demais foram solubilizadas e formaram uma única fase com adições que variaram entre 2,0 e 6,5 mL de etanol. Portanto, para algumas amostras, pode ser necessária a adição de um volume de etanol superior a 3,5 mL, que resultará em diluição de ca. 20 ou 30 vezes.

Na Tabela 5 são apresentados os parâmetros otimizados, as faixas avaliadas e os valores selecionados para a determinação de glicerol livre em biodiesel empregando sistema de fase única.

Tabela 5: Parâmetros otimizados para a determinação de glicerol livre em biodiesel empregando sistema de fase única.

Parâmetros	Faixa avaliada	Valor selecionado
<i>metaperiodato de potássio</i> (mmol L ⁻¹)	1,0 - 10,0	5,0
<i>acetilacetona</i> (mol L ⁻¹)	0,05 - 1,00	0,20
<i>tempo de reação de oxidação</i> (min)	1,8 – 4,3	2,0
<i>tempo de reação com acetilacetona</i> (min)	5 - 30	10
<i>temperatura de banho</i> (°C)	23 - 50	50
<i>tempo de banho</i> (min)	5 - 30	10

3.3. Características analíticas

Após a otimização, as características analíticas do procedimento para a determinação de glicerol em sistema de fase única foram estimadas. Uma curva analítica foi construída com medidas em triplicata e esta apresentou resposta linear entre 40 e 400 mg kg⁻¹ de glicerol, descrita pela equação $A = 0,0018C_{\text{glicerol}} + 0,0204$ e coeficiente de correlação $r^2 = 0,999$ (Figura 12).

Figura 12: Curva de calibração para a determinação de glicerol em sistema de fase única. Concentrações finais dos reagentes: 20 mmol L⁻¹ acetilacetona, 0,2 mmol L⁻¹ metaperiodato de potássio e 67,2% etanol.

A faixa linear de concentração abrange a especificação estipulada pela ANP que é de 200 mg kg⁻¹. O limite de detecção foi estimado, baseado na variação do sinal do branco, em 2,0 mg kg⁻¹ de glicerol com nível de confiança de 99,7%. Este valor é 100 vezes menor que o limite máximo estabelecido pelos órgãos de controle^{7, 34}. A repetibilidade foi avaliada com uma solução de amostra de biodiesel de soja (n=10) e o coeficiente de variação foi estimado em 2,1%.

A precisão e o limite de detecção do procedimento desenvolvido são comparáveis com os obtidos em outros procedimentos apresentados na literatura^{9, 14, 39, 48}. Embora o trabalho proposto por Hajek e colaboradores⁹, apreciáveis coeficiente de variação e limite de detecção foram estimados em 1,8% e 4 mg kg⁻¹,

respectivamente, e a quantidade de amostra empregada por determinação é de 4 a 20 vezes maior que no procedimento proposto no presente trabalho. Os procedimentos baseados em voltametria¹⁴ e cromatografia de íons³⁹ empregam 2 e 5 gramas de amostra por determinação e apresentam limite de detecção de 2,3 e 0,7 mg kg⁻¹, respectivamente. Entretanto, em todos os procedimentos mencionados, a extração líquido-líquido é empregada e o tempo gasto durante a etapa de preparo de amostra é de pelo menos uma hora.

3.4. Avaliação de efeitos de matriz

Para avaliar a ocorrência de efeitos da matriz, três amostras de biodiesel oriundas de diferentes matérias-primas foram utilizadas. Todas foram diluídas 10 vezes com etanol anidro. A cada uma delas, foram adicionadas quantidades diferentes de glicerol, correspondendo a concentrações finais de 0,38 e 0,77 mg L⁻¹. Uma solução obtida pela substituição do biodiesel por etanol anidro foi avaliada da mesma forma para efeito de comparação. A Figura 13 apresenta as curvas referentes aos sinais de absorbância obtidos.

Figura 13: Curvas de calibração em meio à amostra de biodiesel oriundas de diferentes matérias-primas.

Para a amostra de biodiesel produzido a partir do óleo de soja, os sinais de absorbância coincidiram com os obtidos com as soluções de referência, indicando ausência de efeitos de matriz. Entretanto, para as amostras oriundas do óleo de mamona e principalmente de sebo bovino, foram verificados efeitos de matriz. O método das adições de analito foi então empregado para a quantificação de glicerol livre em biodiesel.

3.4.1. Compensação de sinal espúrio devido à absorção de radiação pela amostra

A maior parte das amostras de biodiesel possui cor amarela, principalmente as oriundas de óleo de soja, as quais representam ca. 80% de todo o biodiesel produzido no país⁵. A intensidade da cor pode variar mesmo para biodiesel produzido a partir da mesma matéria-prima, devido às diferentes condições e processos empregados.

Para verificar a contribuição da absorção pela amostra no comprimento de onda de medida, amostras de biodiesel foram diluídas em 10 vezes em etanol anidro e foram obtidos espectros de absorção na região do ultravioleta e do visível (Figura 14).

Figura 14: Espectros de absorção de amostras de biodiesel de diferentes matérias-primas diluídas 10 vezes em etanol anidro.

Todas as amostras de biodiesel absorveram radiação, embora com diferentes intensidades, em comprimentos de onda próximos a 410 nm. Este problema torna-se mais crítico, pois a etapa de extração do glicerol foi evitada no procedimento proposto. Desta forma, para a determinação de glicerol empregando um sistema de fase única, uma solução deve ser preparada com ausência do oxidante, metaperiodato de potássio, para compensar a absorção de radiação devido à amostra.

3.5. Comparação com procedimento de referência

Os resultados obtidos na análise de 6 amostras de biodiesel oriundas de diferentes matérias-primas pelo procedimento proposto e pelo procedimento espectrofotométrico descrito por Bondiolli e Della Bella¹⁶ foram comparados. Ambos os procedimentos são baseados na oxidação do analito a formaldeído e posterior

reação com acetilacetona em meio amoniacal. Entretanto, o procedimento de referência emprega uma etapa de preparo de amostra trabalhosa, a qual utiliza equipamentos mecânicos para agitação e separação de fases, além de solventes tóxicos para a extração.

As amostras de biodiesel foram analisadas conforme fluxograma descrito na Figura 1. Devido à baixa miscibilidade da amostra de biodiesel Soja II, como apresentado na Tabela 4, uma diluição inicial da amostra de 20 vezes (ao invés de 10 vezes) foi aplicada para este biodiesel e ao final do procedimento, foram adicionados 5,0 mL (ao invés de 3,5) para garantir a formação de uma única fase. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos por ambos os procedimentos.

Tabela 6: Valores das concentrações obtidas na determinação de glicerol livre em biodiesel (n=3) pelos procedimentos proposto e de referência.

<i>Amostra de Biodiesel</i>	Concentração de glicerol (mg kg⁻¹)	
	<i>Procedimento Proposto</i>	<i>Procedimento de Referência*</i>
<i>Soja I</i>	45,8 ± 2,9	50,7 ± 3,2
<i>Soja II</i>	220 ± 4	214 ± 3
<i>Soja III</i>	42,8 ± 4,3	50,3 ± 3,2
<i>Sebo Bovino</i>	331±13	309 ± 21
<i>Óleo de Fritura</i>	81,4 ± 5,9	76,3 ± 3,9
<i>Algodão</i>	60,7 ± 1,9	57,1 ± 2,9
<i>Mamona I</i>	312 ± 11	310 ± 22

Os resultados obtidos nas análises das amostras pelo procedimento proposto foram concordantes com os obtidos pelo procedimento de referência, com nível de confiança de 95%.

Para a determinação *in situ* de glicerol livre em biodiesel, através do procedimento proposto, espectrofotômetros ou fotômetros portáteis, comercialmente disponíveis, podem ser empregados. Alternativamente, a custo relativamente baixo, podem ser utilizados fotômetros com LED como fonte de emissão. No caso específico desta aplicação, um LED com máxima emissão em 405 nm, disponível comercialmente, seria adequado. Os reagentes, armazenados e transportados em recipientes de polipropileno, são estáveis à temperatura ambiente por mais de 15 dias. A diluição das amostras e adição dos reagentes podem ser realizadas com auxílio de micropipetas, empregando a graduação existente nos tubos.

4

Conclusões

4. Conclusões

A determinação de glicerol livre em amostras de biodiesel em sistema de fase única apresentou ser uma excelente alternativa para o monitoramento *in situ* deste analito. O procedimento é rápido e simples, pode ser realizado em menos de 30 minutos, não utiliza solventes tóxicos ou equipamentos mecânicos para a agitação e centrifugação. Também foi possível diminuir as quantidades de reagentes e de resíduos gerados (200 μg de KIO_4 , 10 mg de acetilacetona e 4,0 mL de etanol por determinação). As concentrações dos reagentes metaperiodato de potássio e acetilacetona foram reduzidas em 14 e 2,4 vezes, respectivamente, em relação ao procedimento de referência. A etapa de aquecimento é necessária. Entretanto, a diminuição de temperatura permite o emprego de sistemas de aquecimento portáteis que facilmente atingem os 50 °C, tornando a condição para análise mais branda e evitando perdas de reagentes e/ou solventes, como no caso do etanol. O resfriamento é também mais rápido quando comparado ao procedimento de referência.

Efeito de matriz foi observado para algumas amostras e, devido à complexidade e variabilidade de matérias-primas para a produção de biodiesel, é recomendada calibração pelo método das adições de analito.

As características analíticas demonstraram as potencialidades da utilização do sistema em fase única para a quantificação de glicerol livre em amostras de biodiesel. O procedimento apresentou coeficiente de variação (2,1%) e limite de detecção (2,0 mg kg⁻¹) comparáveis com outros procedimentos descritos na literatura^{9, 14, 48}. A diluição direta da amostra em etanol anidro evitou possíveis perdas do analito que poderiam ocorrer nos processos de extração líquido-líquido ou em fase sólida. Os resultados para as amostras oriundas de diferentes matérias-

primas foram concordantes com os obtidos pelo procedimento de referência com nível de confiança de 95 %. Todas as características indicam que o procedimento desenvolvido pode ser empregado como uma alternativa para a determinação de glicerol livre em amostras de biodiesel em postos de abastecimento ou em plantas industriais próximas a área de produção, permitindo uma triagem das amostras com teor de glicerol duvidoso ou próximo ao estipulado pela ANP ou para reavaliar o processo de produção evitando perda e/ou reproprocessamento do biocombustível gerado.

5

Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

1. Knothe, G., Gerpen, J.V., e Kahl, J. ***The Biodiesel Handbook***. EUA: AOCS Press, 2005.p. 2-10.
2. ***Acidente no Golfo do México custa mais de 500 mi de libras***. Revista Exame On-line, Editora Abril, 24/05/2010. Disponível em: < <http://exame.abril.com.br/economia/meio-ambiente-e-energia/noticias/acidente-golfo-mexico-custa-mais-500-mi-libras-562595> >. Acesso em: 06/05/2011.
3. Suarez, P.A.Z. e Meneghetti, S.M.P., ***70º Aniversário do biodiesel em 2007: evolução histórica e situação atual no Brasil***. Química Nova. Química Nova, 2007. **30**: p. 2071.
4. Schuchardt, U., Sercheli, R., e Vargas, R.M., ***Transesterification of vegetable oils: a review***. Journal of the Brazilian Chemical Society, 1998. **9**(3): p. 199-210.
5. Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis, ***Boletim Mensal de Biodiesel***. Maio de 2011. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=57522&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1315184294476>.
6. Knothe, G., Dunn, R.O., e Bagby, M.O., ***Biodiesel: The use of vegetable oils and their derivatives as alternative diesel fuels***, in *Fuels and Chemicals from Biomass*, B.C. Saha, et al., Editors. 1997. p. 172-208.
7. Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis, ***Resolução nº 7, 19 de março de 2008***. Diário Oficial da União, 2008.
8. Monteiro, M.R., Ambrozini, A.R.P., Liao, L.M., e Ferreira, A.G., ***Critical review on analytical methods for biodiesel characterization***. Talanta, 2008. **77**(2): p. 593-605.

9. Hajek, M., Skopal, F., e Macheck, J., **Determination of free glycerol in biodiesel**. European Journal of Lipid Science and Technology, 2006. **108**(8): p. 666-669.
10. Mercer, E.J. e Halaweish, F., **Determination of Free Glycerol in Biodiesel via Solid-Phase Extraction and Spectrophotometric Analysis**. Journal of the American Oil Chemists Society, 2010. **88**(5): p. 655-659.
11. Nebel, B., Mittelbach, M., e Uray, G., **Determination of the Composition of Acetylglycerol Mixtures by H-1 NMR Followed by GC Investigation**. Analytical Chemistry, 2008. **80**(22): p. 8712-8716.
12. Krug, F.J. **Métodos de preparo de amostras**. Piracicaba, SP: CIP-CENA/USP, 2008.p. 36.
13. Pinzi, S., Priego Capote, F., Ruiz Jimenez, J., Dorado, M.P., e Luque de Castro, M.D., **Flow injection analysis-based methodology for automatic on-line monitoring and quality control for biodiesel production**. Bioresource technology, 2009. **100**(1): p. 421-7.
14. Lourenco, L.M. e Stradiotto, N.R., **Determination of free glycerol in biodiesel at a platinum oxide surface using potential cycling technique**. Talanta, 2009. **79**(5): p. 1489-1489.
15. Gonçalves, L.C. e Micke, G.A., **Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis**. Journal of Chromatography A, 2007. **1154**(1-2): p. 477-480.
16. Bondioli, P. e Della Bella, L., **An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel**. European Journal of Lipid Science and Technology, 2005. **107**(3): p. 153-157.
17. Callis, J.B., Illman, D.L., e Kowalski, B.R., **Process Analytical-Chemistry**. Analytical Chemistry, 1987. **59**(9): p. A624-&.
18. Chauvel, J.P., Henslee, W.W., e Melton, L.A., **Teaching process analytical chemistry**. Analytical Chemistry, 2002. **74**(13): p. 380a-384a.

19. Williams, D. e Pappas, G., ***Rapid identification of nerve agents sarin (GB) and soman (GD) with the use of a field-portable GC/SAW vapor detector and liquid desorption front-end device***. Field Analytical Chemistry and Technology, 1999. **3**(1): p. 45-53.
20. Aldstadt, J.H., Olson, D.C., Wolcott, D.K., Marshall, G.D., Szostek, B., e Martin, A.F., ***Determination of Lewisite in the environment using a field-portable monitor***. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1997. **214**: p. 130-ANYL.
21. Stec, K., Bobrowski, A., Kalcher, K., Moderegger, H., e Goessler, W., ***Determination of arsenic in dolomites with a simple field spectrometric device***. Microchimica Acta, 2006. **153**(1-2): p. 45-49.
22. Haglund, P. e Larsson, L., ***Determination of Mercury in Air with Portable Apparatus***. Svensk Papperstidning-Nordisk Cellulosa, 1971. **74**(8): p. 241-&.
23. Arzamendi, G., Arguinarena, E., Campo, I., e Gandia, L., ***Monitoring of biodiesel production: Simultaneous analysis of the transesterification products using size-exclusion chromatography***. Chemical Engineering Journal, 2006. **122**(1-2): p. 31-40.
24. Cvengros, J. e Cvengrosova, Z., ***Quality-control of rapeseed oil methyl-esters by determination of acyl conversion***. Journal of the American Oil Chemists Society, 1994. **71**(12): p. 1349-1352.
25. Freedman, B., Kwolek, W.F., e Pryde, E.H., ***Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capillary gas-chromatography***. Journal of the American Oil Chemists Society, 1986. **63**(10): p. 1370-1375.
26. Freedman, B., Pryde, E.H., e Kwolek, W.F., ***Thin-layer chromatography flame ionization analysis of transesterified vegetable-oils***. Journal of the American Oil Chemists Society, 1984. **61**(7): p. 1215-1220.
27. Knothe, G., ***Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel***. Transactions of the Asae, 2001. **44**(2): p. 193-200.

28. Knothe, G., ***Monitoring a progressing transesterification reaction by fiber-optic near infrared spectroscopy with correlation to H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy***. Journal of the American Oil Chemists Society, 2000. **77**(5): p. 489-493.
29. Ghesti, G.F., de Macedo, J.L., Braga, V.S., de Souza, A., Parente, V.C.I., Figueredo, E.S., Resck, I.S., Dias, J.A., e Dias, S.C.L., ***Application of Raman spectroscopy to monitor and quantify ethyl esters in soybean oil transesterification***. Journal of the American Oil Chemists Society, 2006. **83**(7): p. 597-601.
30. Morgenstern, M., Cline, J., Meyer, S., e Cataldo, S., ***Determination of the kinetics of biodiesel production using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (H-1 NMR)***. Energy & Fuels, 2006. **20**(4): p. 1350-1353.
31. Singhabhandhu, A. e Tezuka, T., ***A perspective on incorporation of glycerin purification process in biodiesel plants using waste cooking oil as feedstock***. Energy, 2010. **35**(6): p. 2493-2504.
32. Ranganna, K., Yousefipour, Z., Nasif, R., Yatsu, F.M., Milton, S.G., e Hayes, B.E., ***Acrolein activates mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways in rat vascular smooth muscle cells***. Molecular and Cellular Biochemistry, 2002. **240**(1-2): p. 83-98.
33. Szadkowski, A. e Myers, C.R., ***Acrolein oxidizes the cytosolic and mitochondrial thioredoxins in human endothelial cells***. Toxicology, 2008. **243**(1-2): p. 164-76.
34. ASTM_D6584, ***Test method for determination of free and total glycerin in B100 biodiesel methyl esters by gas chromatography***. ASTM International, 2004.
35. Plank, C. e Lorbeer, E., ***Simultaneous determination of glycerol, and monodiglycerides, diglycerides and triglycerides in vegetable oil methyl-esters by capillary gas-chromatography***. Journal of Chromatography A, 1995. **697**(1-2): p. 461-468.

36. La Rovere, E.L., Pereira, A.S., e Simoes, A.F., ***Biofuels and Sustainable Energy Development in Brazil***. World Development, 2011. **39**(6): p. 1026-1036.
37. Mercer, E.J. e Halaweish, F., ***Determination of Free Glycerol in Biodiesel via Solid-Phase Extraction and Spectrophotometric Analysis***. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2010. **88**(5): p. 655-659.
38. Silva, S., Morales-Rubio, Á., de La Guardia, M., e Rocha, F., ***Sequential spectrofluorimetric determination of free and total glycerol in biodiesel in a multicommuted flow system***. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **401**(1): p. 365-371.
39. Gandhi, J., Wille, A., e Steinbach, A., ***Ion Chromatographic Determination of Free and Total Glycerol in Biodiesel and Biodiesel Blends***. Lc Gc Europe, 2009: p. 29.
40. Deandrade, J.B., Pinheiro, H.L.C., e Andrade, M.V., ***Determination of Formaldehyde and Acetaldehyde Associated to Atmospheric Aerosols by Hplc***. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1993. **52**(1-4): p. 49-56.
41. de Andrade, J.B., Bispo, M.S., Reboucas, M.V., Carvalho, M.L.S.M., e Pinheiro, H.L.C., ***Spectrofluorimetric determination of formaldehyde in liquid samples***. American Laboratory, 1996. **28**(12): p. 56-59.
42. de Andrade, J.B., Andrade, M.V., e Pinheiro, H.L.C., ***Atmospheric levels of formaldehyde and acetaldehyde and their relationship with the vehicular fleet composition in Salvador, Bahia, Brazil***. Journal of the Brazilian Chemical Society, 1998. **9**(3): p. 219-223.
43. Dong, S. e Dasgupta, P.K., ***Fast Fluorometric Flow-Injection Analysis of Formaldehyde in Atmospheric Water***. Environmental Science & Technology, 1987. **21**(6): p. 581-588.

44. deAndrade, J.B., Reis, J.N., Reboucas, M.V., Pinheiro, H.L.C., e Andrade, M.V., ***Determination of formaldehyde and acetaldehyde in drinking water and alcoholic beverages by high performance liquid chromatography (HPLC)***. Quimica Analitica, 1996. **15**(2): p. 144-147.
45. Garcia, A.J.C. e Reis, B.F., ***Instrumentation and automated photometric titration procedure for total acidity determination in red wine employing a multicommuted flow system***. Journal of Automated Methods & Management in Chemistry, 2006. p. 100-105.
46. Teixeira, L.S.G., Leao, E.S., Dantas, A.F., Pinheiro, H.L.C., Costa, A.C.S., e de Andrade, J.B., ***Determination of formaldehyde in Brazilian alcohol fuels by flow-injection solid phase spectrophotometry***. Talanta, 2004. **64**(3): p. 711-715.
47. Dorado, M.P., Pinzi, S., de Haro, A., Font, R., e Garcia-Olmo, J., ***Visible and NIR Spectroscopy to assess biodiesel quality: Determination of alcohol and glycerol traces***. Fuel, 2011. **90**(6): p. 2321-2325.
48. Silva, S.G. e Rocha, F.R.P., ***A flow injection procedure based on solenoid micro-pumps for spectrophotometric determination of free glycerol in biodiesel***. Talanta, 2010. **83**(2): p. 559-564.
49. Dagnelie, R.V.H., Crassous, A., e Tran-Thi, T.H., ***Scaling the hydrophobicity of porous materials to water vapour with Fluoral-P***. Journal of Membrane Science, 2010. **365**(1-2): p. 98-105.
50. Pinheiro, H.L.C. e Jesus, D.S.C., F., ***Importância do monitoramento de formaldeído em ambientes hospitalares utilizando o reagente Fluoral "P" e detecção espectrofluorimétrica***. Anais do Congresso Nacional da ABDEH, 2004.
51. Compton, B.J. e Purdy, W.C., ***Fluoral-P, a Member of a Selective Family of Reagents for Aldehydes***. Analytica Chimica Acta, 1980. **119**(2): p. 349-357.

52. Pinheiro, H.L.C., de Andrade, M.V., Pereira, P.A.P., e de Andrade, J.B., ***Spectrofluorimetric determination of formaldehyde in air after collection onto silica cartridges coated with Fluoral P***. Microchemical Journal, 2004. **78**(1): p. 15-20.
53. Nash, T., ***The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction***. Biochemical Journal, 1953. **55**(3): p. 416-421.
54. Skoog, D.A., Holler, F.J., e Nieman, T.A. ***Princípios de análise instrumental***. Porto Alegre: Bookman, 2002.p. 277.
55. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., e Nieman, T.A. ***Fundamentos de Química Analítica***. São Paulo: Thomson Learning, 2006.p. 999.
56. Lide, D.R. ***Handbook of Chemistry and Physics***. 87º Edição Edição. EUA: CRC Press, 2006.
57. Solomons, T.W.G. e Fryhle, C.B. ***Organic Chemistry***. 9ª Edição Edição. EUA: John Wiley & Sons , Inc., 2007.p. 686-699.