

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

SAMARA SOARES

**Estratégias de calibração, imagens digitais e dispositivo
microfluídico para o controle de qualidade de biodiesel**

Piracicaba
2023

SAMARA SOARES

**Estratégias de calibração, imagens digitais e dispositivo
microfluídico para o controle de qualidade de biodiesel**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor
em Ciências**

**Área de Concentração: Química na
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo
Piovezani Rocha**

Piracicaba

2023

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Soares, Samara

Estratégias de calibração, imagens digitais e dispositivo microfluídico para o controle de qualidade de biodiesel / Samara Soares; orientador Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

174 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Analitos 2. Biocombustíveis 3. Calibração multi-energia
4. Colorimetria 5. Fotometria 6. Microanálise 7. Óleos vegetais como combustíveis 8. Química analítica verde 9. Química verde 10. Telefone celular 11. Volumetria I. Título

CDU 543 : 662.756

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB N° 184 de 29 de setembro de 2017

*Dedico este trabalho a todas as mulheres que querem trilhar o caminho da Ciência.
Somos muito mais capazes do que imaginamos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por orientar meu caminho e mostrar que a constância é essencial em todas as etapas da vida.

Agradeço em especial ao meu orientador, Prof. Fábio Rocha, que desde o mestrado apostou e acreditou no meu potencial. Seu olhar como professor e pesquisador contribuiu para a Samara Soares se revelar como pesquisadora e deixar sua contribuição para o campo da química analítica.

À minha mãe (Marli) e irmãos (Kayalla e Rodrigo) que sempre me incentivaram nos momentos difíceis, diretamente ou indiretamente, e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho e à busca de meu sonho.

Aos Professores Alex Batista (Hahn-Schickard Institute, Alemanha), Wanessa Mattos (ESALQ/USP), George Donati (Wake Forest University, EUA), Luis Fermin Capitan-Vallvey e Miguel Erenas (Universidade de Granada, Espanha) e aos doutorandos Gabriel (CENA/USP), Karoline (CENA/USP) e Celia (Universidade de Granada, Espanha) e mestrandos Luís, Isabela e Raissa (CENA/USP) pelos trabalhos realizados em conjunto.

Ao Luís, Rita, Isabela e Raissa pela amizade e por acreditarem que eu poderia contribuir no trabalho de mestrado de vocês. Contem sempre comigo!

Aos Professores Boaventura, Zagatto, Chico e Alex pela oportunidade de conhecê-los. São pesquisadores a quem tenho muita admiração e respeito.

À Claudia, Fátima, Liz, Marília e Sheila, pela amizade incondicional, apoio ao longo de todo esse tempo e pelas belíssimas palavras de encorajamento e conforto.

Aos Professores Leonardo Teixeira (UFBA), Joaquim Nóbrega (UFSCar) e Wanessa Mattos (ESALQ, USP) pelas sugestões no exame de qualificação.

Aos demais amigos da Química Analítica, pelos bons momentos de descontração.

Ao CENA, em especial ao Laboratório de Química Analítica "*Henrique Bergamin Filho*", por toda infraestrutura oferecida para a realização dessa Tese.

À Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) e à Petrobras pelo fornecimento das amostras de biodiesel e diesel e quantificação dos teores de ésteres por MIR.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa no país, processo 2016/00138-0 e no exterior, processo 2021/12242-5.

Ao grupo ECsens da Universidade de Granada por todo apoio e conhecimentos compartilhados durante o estágio no exterior. Em especial, agradeço aos Professores Luis Fermin e Miguel Erenas.

Muito obrigada a todos!

“Seja menos curioso sobre as pessoas e mais curioso sobre as ideias.”

Marie Curie

RESUMO

SOARES, S. **Estratégias de calibração, imagens digitais e dispositivo microfluídico para o controle de qualidade de biodiesel**. 2023. 174 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

A presente Tese apresenta o desenvolvimento de procedimentos analíticos para a quantificação de metanol, teor de éster e Ca e Mg em biodiesel e de biodiesel em misturas com diesel ou óleo vegetal, além da avaliação de estratégias de calibração para contornar efeitos de matriz nessas análises. A quantificação de metanol, Ca e Mg e biodiesel em diesel foi baseada em fotometria por imagens digitais (DIP, do inglês *Digital-image photometry*) obtidas com a câmera de um *smartphone*. A quantificação de metanol foi baseada na oxidação a formaldeído e na reação subsequente com o reagente de *Schiff*. Duas faixas lineares foram obtidas 20–500 e 500–2000 mg kg⁻¹ de metanol, com coeficiente de variação (CV, n = 10) de 5,0% e limite de detecção (LD) de 10 mg kg⁻¹. Também foi desenvolvido um procedimento alternativo simples e de baixo custo para a separação do metanol de biodiesel por microdestilação. O método foi baseado na descoloração de uma solução ácida de KMnO₄, ocasionada pela oxidação do metanol a formaldeído. Resposta linear foi obtida entre 250–2000 mg kg⁻¹, com CV (n = 10) e LD estimados em 3,7% e 90 mg kg⁻¹, respectivamente. O método analítico para quantificação de Ca e Mg foi baseado na descoloração de uma solução alcalina de Negro de Eriocromo T. Resposta linear foi obtida de 10–75 μmol L⁻¹, com CV (n = 10) e o LD estimados em 1,0% e 3 μmol L⁻¹. Um procedimento volumétrico foi desenvolvido para a quantificação de biodiesel em mistura com diesel ou óleo vegetal, usando solução aquo-etanólica como titulante. Respostas lineares foram obtidas até 25 %(v/v) (mistura diesel:biodiesel) e até 80 %(v/v) (mistura biodiesel:óleo vegetal). Os CV (n = 10) e os LD para biodiesel em mistura com diesel ou óleo vegetal foram 6,8% e 2 %(v/v) e 5,6% e 7 %(v/v), respectivamente. O primeiro procedimento para contornar efeito de matriz explorou a calibração multi-energia (MEC) com detecção espectrofotométrica e foi desenvolvido para quantificação de índice de iodo e glicerol livre em biodiesel. O CV (n = 8) e LD foram estimados em 1,7% e 5 g I₂/100 g para índice de iodo e 3,0% e 10 mg kg⁻¹ para glicerol livre, respectivamente. Em outra abordagem MEC foi pioneiramente associada com DIP para contornar a interferência do glicerol na quantificação de metanol em biodiesel. Resposta linear foi obtida entre 20–500 mg L⁻¹ de metanol, com CV (n = 10) e LD estimados em 3,5% e 7,0 mg L⁻¹, respectivamente. Um dispositivo microfluídico foi desenvolvido para a quantificação de biodiesel em blendas de diesel, explorando a reação dos ésteres com NH₂OH, em meio básico, para formar hidroxamato, seguida de complexação com Fe(III) em meio ácido. Resposta linear foi obtida entre 0,1–0,6 %(v/v) de linoleato de metila, com CV (n = 10) e LD estimados em 4,0% e 0,04 %(v/v), respectivamente. Os procedimentos desenvolvidos são práticos, requerem pequenas quantidades de solventes orgânicos e reagentes e geram baixos volumes de resíduos. Efeitos de matriz foram contornados e a exatidão foi demonstrada em comparação aos procedimentos de referência.

Palavras-chave: Controle de qualidade. Biodiesel. Química analítica verde. Calibração multi-energia.

ABSTRACT

SOARES, S. **Calibration strategies, digital images and microfluidic device for quality control of biodiesel**. 2023. 174 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

This Thesis presents the development of analytical procedures for the quantification of methanol, alkyl ester and Ca and Mg contents in biodiesel as well as biodiesel in diesel or vegetable oil blends, and the evaluation of calibration strategies to circumvent matrix effects in these analyses. Procedures for quantification of methanol, Ca and Mg and biodiesel in diesel blends were based on DIP exploiting a smartphone camera. Methanol quantification was based on oxidation to formaldehyde and subsequent reaction with Schiff reagent. Two linear responses were obtained from 75–500 mg kg⁻¹ and 500–2000 mg kg⁻¹ methanol, with a coefficient of variation (CV, n = 10) of 5% and detection limit (LD) of 25 mg kg⁻¹. A simple and low-cost alternative procedure for methanol microdistillation from biodiesel was also developed. It was based on the discoloration of an acid potassium permanganate solution, caused by the oxidation of methanol to formaldehyde. A linear response was obtained from 250–2000 mg kg⁻¹, with CV (n = 10) and LD estimated at 3.7% and 90 mg kg⁻¹. The analytical method for determining Ca and Mg was based on the discoloration of an alkaline Eriochrome black T solution. A linear response was obtained from 10–75 μmol L⁻¹, with CV (n = 10) and LD estimated at 1.0% and 3 μmol L⁻¹, respectively. A novel volumetric procedure was also developed for the quantification of biodiesel in diesel or vegetable oil blends, using an aquo-ethanol solution as titrant. Linear responses were obtained up to 25 % (v/v) (diesel:biodiesel) and up to 80 % (v/v) (biodiesel:vegetable oil). The CV (n = 10) and LD were 6.8% and 2 % (v/v) for diesel samples and 5.8% and 7 % (v/v) for vegetable oil samples. Multi-energy calibration (MEC) was explored to circumvent matrix effects and the feasibility was demonstrated for iodine value and free glycerol quantification in biodiesel. The CV (n = 8) and LD were estimated at 1.7% and 5 g I₂/100 g for iodine value and 3.0% and 10 mg kg⁻¹ for free glycerol. In another approach, MEC was pioneeringly associated to DIP to circumvent glycerol interference on methanol quantification in biodiesel. A linear response was obtained within 20–500 mg L⁻¹ methanol, with CV (n = 10) and LD estimated at 3.5% and 7 mg L⁻¹, respectively. A microfluidic device was developed for the quantification of biodiesel in diesel blends, based on the reaction of alkyl esters with hydroxylamine, in a basic medium, to form hydroxamate, which formed a violet complex with Fe(III) in an acidic medium. A linear response was obtained within 0.1–0.6 % (v/v) of methyl linoleate, with CV (n = 10) and LD estimated at 4.0% and 0.04 % (v/v), respectively. The mentioned procedures stand out by practicality, cost-effectiveness, and greenness, consuming low amounts of organic solvents and reagents, and generating low waste amounts. Matrix effects were circumvented, and accuracy was demonstrated in comparison with reference procedures.

Keywords: Quality control. Biodiesel. Green analytical chemistry. Multi-energy calibration.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de qualidade do biodiesel	30
Tabela 2. Recuperações de metanol adicionado à amostras de biodiesel produzido de diferentes matérias-primas	61
Tabela 3. Quantificação de metanol em biodiesel pelos procedimentos proposto e de referência	62
Tabela 4. Quantificação de metanol em biodiesel pelo procedimento explorando microdestilação e de referência.....	69
Tabela 5. Principais características dos procedimentos para quantificar metanol em biodiesel	71
Tabela 6. Recuperações de Ca adicionado em amostras de biodiesel obtidas de diferentes matérias-primas	87
Tabela 7. Recuperações de Ca e Mg adicionado em amostras de biodiesel.....	88
Tabela 8. Quantificação de Ca e Mg em biodiesel pelos procedimentos proposto e de referência.	88
Tabela 9. Características analíticas de procedimentos para a quantificação de Ca e Mg em biodiesel	90
Tabela 10. Equações de calibração MEC para a quantificação de índice de iodo e de glicerol livre em amostras de biodiesel obtidas de diferentes matérias-primas.....	104
Tabela 11. Quantificação de glicerol livre em biodiesel pelo procedimento proposto com calibração externa, adições de padrão e MEC e de referência	105
Tabela 12. Quantificação de índice de iodo em biodiesel pelos procedimentos de adição de padrão, calibração externa, calibração multi-energia e de referência.....	105
Tabela 13. Características analíticas de procedimentos para a quantificação de índice de iodo e glicerol livre em biodiesel.....	107
Tabela 14. Recuperações estimadas pelo procedimento MEC-DIP.....	120
Tabela 15. Recuperações de sulfato de níquel(II) determinadas pelo procedimento fotométrico explorando MEC-DIP.....	121
Tabela 16. Valores médios e incertezas das concentrações de metanol determinadas por MEC-DIP e calibração externa em amostras simuladas com diferentes quantidades de glicerol.	122

Tabela 17. Teores de biodiesel determinados em misturas com diesel pelos procedimentos proposto e referência	134
Tabela 18. Teores de biodiesel determinados em misturas com óleo vegetal pelos procedimentos proposto e referência	135
Tabela 19. Características analíticas dos procedimentos para a quantificação do teor de éster em biodiesel e biodiesel em misturas com o diesel	136
Tabela 20. Porcentagens de recuperação de biodiesel produzido de diferentes matérias-primas e blendas com o diesel S10 ou S500.....	154
Tabela 21. Teores de biodiesel determinados na mistura biodiesel:diesel pelos procedimentos proposto e de referência.....	154
Tabela 22. Características analíticas dos procedimentos para a quantificação do teor de éster na mistura com o diesel	156

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os 12 princípios da química verde	34
Figura 2. Os 12 princípios da química analítica verde.....	35
Figura 3. Ilustração dos sistemas de cores RGB, CMY, HSV, XYZ e Lab	38
Figura 4. Aplicação da estratégia MEC à quantificação espectrofotométrica.....	48
Figura 5. Representação da câmara utilizada para as medidas fotométricas	48
Figura 6. Etapas do procedimento de extração de metanol e formação do produto de medida com o reagente de <i>Schiff</i>	50
Figura 7. Representação da câmara utilizada para as medidas fotométricas no procedimento proposto explorando microdestilação	51
Figura 8. Etapas do procedimento de microdestilação para a quantificação de metanol	52
Figura 9. Espectros de absorção do produto da reação de <i>Schiff</i> formado a partir de metanol e glicerol.	54
Figura 10. Efeito do volume de KMnO_4 na resposta analítica para metanol e glicerol.	57
Figura 11. Efeito do volume de ácido oxálico na resposta analítica para metanol e sinal do branco.	58
Figura 12. Efeito do volume de reagente de <i>Schiff</i> na resposta analítica para metanol e sinal do branco.	59
Figura 13. Efeito do tempo no processo de extração do metanol, oxidação do metanol pelo KMnO_4 e formação do produto de medida	60
Figura 14. Representação esquemática e fotografia do sistema de microdestilação	63
Figura 15. Espectro de absorção da solução de KMnO_4 e região espectral coberta pelo canal G.....	64
Figura 16. Efeito da concentração do H_2SO_4 na resposta analítica para metanol e sinal de referência.	65
Figura 17. Efeito do volume de solução de KMnO_4 na resposta analítica para metanol e sinal de referência.	66
Figura 18. Efeito do volume de amostra na resposta analítica para metanol e sinal do branco.	67

Figura 19. Efeito do tempo na resposta analítica para metanol e sinal do branco....	68
Figura 20. Etapas do procedimento fotométrico para a quantificação de Ca e Mg...	77
Figura 21. Diagrama de distribuição das espécies de NET em função do pH.	78
Figura 22. Espectros de absorção da solução de NET e do complexo $[Ca(NET)_2]^{4-}$	80
Figura 23. Efeito do volume de NaOH na resposta analítica para Mg, Ca e sinal de referência.....	82
Figura 24. Efeito do volume de NET na resposta analítica para Mg, Ca e sinal de referência.....	83
Figura 25. Efeito do tempo de reação na resposta analítica para Mg, Ca e sinal de referência.....	84
Figura 26. Gráfico de Pareto referente ao planejamento fatorial completo 2^3 para avaliação de robustez do procedimento para a quantificação de Ca e Mg.....	85
Figura 27. Curvas de calibração construídas com soluções padrão de Ca, Mg e Ca + Mg em quantidades equimolares.....	86
Figura 28. Aplicação da estratégia MEC à quantificação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel.....	100
Figura 29. Aplicação da estratégia MEC à quantificação espectrofotométrica de índice de iodo em biodiesel.....	102
Figura 30. Variação da resposta nos sistemas de cores RGB, CMY e HSV em função da concentração de vermelho de metila.	116
Figura 31. Variação da resposta nos sistemas de cores RGB, CMY e HSV em função da concentração da solução de níquel(II).	117
Figura 32. Variação da resposta nos sistemas de cores RGB, CMY e HSV em função da concentração da solução de azul brilhante.....	118
Figura 33. Etapas do procedimento volumétrico para a quantificação de biodiesel em misturas com diesel ou óleo vegetal.....	128
Figura 34. Efeito da porcentagem de água no titulante na resposta analítica.	130
Figura 35. Efeito do volume de amostra na resposta analítica.	131
Figura 36. Efeito do volume de etanol para a solubilização da amostra na resposta analítica..	132
Figura 37. Efeito da temperatura nas inclinações das curvas analíticas.....	133

Figura 38. Fotografias do dispositivo microfluídico e da área de interesse para as medidas fotométricas para a quantificação de biodiesel em misturas com o diesel	143
Figura 39. Efeito do volume de solução de NH_2OH sobre os sinais analítico e do branco.	146
Figura 40. Efeito do volume de solução de NaOH sobre os sinais analítico e do branco.	147
Figura 41. Efeito do volume de solução de Fe(III) sobre os sinais analítico e do branco	148
Figura 42. Efeito do volume de solução de linoleato de metila sobre os sinais analítico e do branco.	149
Figura 43. Efeito do tempo de reação para a formação do íon hidroxamato sobre os sinais analítico e do branco.	150
Figura 44. Efeito do tempo de reação entre o hidroxamato e o Fe(III) sobre os sinais analítico e do branco.	151
Figura 45. Efeito da área e espessura do pNIPAN.....	152
Figura 46. Representação esquemática e fotografia do dispositivo microfluídico para a quantificação de biodiesel em misturas de diesel	153

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
- CMY – Ciano, magenta e amarelo, do inglês *Cyano-Magenta-Yellow*
- CA – Coeficiente angular
- CV – Coeficiente de variação
- DIP – Fotometria por imagens digitais, do inglês *Digital-image photometry*
- EC – Calibração externa, do inglês *External standard calibration*
- EDXRF- – Fluorescência de raios X dispersiva em energia, do inglês *Energy Dispersive X-ray Fluorescence*
- Er – Erros relativos
- FAME – Ésteres metílicos de ácidos graxos, do inglês *Fatty acid methyl esters*
- FIA-SP – Análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica, do inglês *Flow analysis with spectrophotometric detection*
- GC-FID – Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama, do inglês *Gas chromatography with flame ionization detector*
- GC-EI-MS – Cromatografia gasosa com espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons, do inglês *Gas chromatography electron impact mass spectrometry*
- HSV – Matiz, saturação e brilho, do inglês *Hue-Saturation-Value*
- ICP-QMS/QMS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e configuração tandem, do inglês *Inductively coupled plasma tandem mass spectrometry*
- ICP OES – Espectrometria de emissão óptica em plasma acoplado indutivamente, do inglês *Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*
- LD – Limite de detecção
- LQ – Limite de quantificação
- MEC – Calibração multi-energia, do inglês *Multi-energy calibration*

MEC-DIP – Calibração multi-energia em fotometria por imagens digitais, do inglês *multi-energy calibration with digital-image photometry*)

MIP OES – Emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas, do inglês *Microwave-induced plasma optical emission spectrometry*

MIR – Espectroscopia no infravermelho médio, do inglês *Mid-infrared spectroscopy*

NET – Negro de Eriocromo T

PLSR – Regressão por mínimos quadrados parciais, do inglês *Partial least squares regression*

r – Coeficiente de correlação linear

RGB – Vermelho, verde e azul, do inglês *Red-Green-Blue*

RMSEP – Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão, do inglês *Root mean square error of prediction*

ROI – Região de interesse, do inglês *Region of interest*

SAM – Método das adições de padrão, do inglês *Standard additions method*

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid-phase microextraction*

UV – Região ultravioleta do espectro eletromagnético

UV-Vis – Região ultravioleta-visível do espectro eletromagnético

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	27
1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Biodiesel	29
1.1.1. <i>Métodos analíticos para o controle de qualidade de biodiesel</i>	30
1.2. Química analítica verde	32
1.3. Fotometria por imagens digitais obtidas por smartphone	36
1.3.1. <i>Sistemas de cores</i>	36
1.3.2. <i>Aquisição de imagens digitais</i>	39
1.3.3. <i>Processamento de dados</i>	40
1.4. Calibração Multi-energia	42
2. OBJETIVOS	44
3. Quantificação de metanol em biodiesel	45
Resumo	45
Abstract	46
3.1. Introdução	47
3.2. Parte experimental	48
3.2.1. <i>Procedimento analítico explorando extração líquido-líquido e derivação química para quantificar metanol em biodiesel</i>	48
3.2.1.1. Equipamentos e acessórios	48
3.2.1.2. Reagentes e soluções	49
3.2.1.3. Procedimento	49
3.2.2. <i>Procedimento analítico explorando microdestilação para quantificar metanol em biodiesel</i>	50
3.2.2.1. Equipamentos e acessórios	50
3.2.2.2. Reagentes e soluções	51
3.2.2.3. Procedimento	52

3.3. Resultados e Discussão.....	53
<i>3.3.1. Procedimento analítico explorando extração líquido-líquido e derivação química para quantificar metanol em biodiesel.....</i>	53
3.3.1.1. Aspectos gerais.....	53
3.3.1.2. Otimização	55
3.3.1.3. Características analíticas	61
<i>3.3.2. Procedimento analítico explorando microdestilação para quantificar metanol em biodiesel.....</i>	62
3.3.2.1. Aspectos gerais.....	62
3.3.2.2. Otimização	64
3.3.2.3. Características analíticas	68
3.4. Comparação de procedimentos para quantificação de metanol em biodiesel	70
4. Procedimento analítico explorando fotometria por imagens digitais e um sistema de fase única para quantificar Ca e Mg em biodiesel.....	73
Resumo	73
Abstract.....	74
4.1. Introdução	75
4.2. Parte experimental.....	75
4.2.1. Equipamentos e acessórios.....	75
4.2.2. Reagentes e soluções	76
4.2.3. Procedimento.....	76
4.3. Resultados e Discussão.....	78
4.3.1. Aspectos gerais	78
4.3.2. Otimização.....	81
4.3.3. Avaliação de robustez	84
4.3.4. Características analíticas.....	85
4.4. Conclusões.....	91

5. Calibração multi-energia para contornar efeitos de matriz na quantificação de índice de iodo e glicerol livre em biodiesel	92
Resumo.....	92
Abstract.....	93
5.1. Introdução	94
5.2. Parte experimental	95
5.2.1. <i>Equipamentos e acessórios</i>	95
5.2.2. <i>Reagentes e soluções</i>	95
5.2.3. <i>Procedimentos</i>	96
5.3. Resultados e Discussão	97
5.3.1. <i>Aspectos gerais</i>	97
5.3.2. <i>Otimização</i>	98
5.3.2.1. Quantificação de glicerol livre	98
5.3.2.2. Quantificação de índice de iodo.....	100
5.3.3. <i>Características analíticas</i>	102
5.4. Conclusões	108
6. Estratégia de calibração multicanal explorando fotometria por imagens digitais.....	109
Resumo.....	109
Abstract.....	110
6.1. Introdução	111
6.2. Parte experimental	112
6.2.1. <i>Equipamentos e acessórios</i>	112
6.2.2. <i>Reagentes e soluções</i>	113
6.2.3. <i>Procedimento</i>	113
6.2.3.1. Experimentos com soluções modelo	113
6.2.3.2. Quantificação de metanol	114
6.3. Resultados e Discussão	114

6.4. Conclusões.....	122
7. Procedimento volumétrico verde para quantificar biodiesel em mistura com o diesel ou óleo vegetal	123
Resumo	123
Abstract.....	124
7.1. Introdução	125
7.2. Parte experimental.....	126
7.2.1. <i>Equipamentos e acessórios.....</i>	126
7.2.2. <i>Reagentes e soluções</i>	126
7.2.3. <i>Procedimento.....</i>	127
7.3. Resultados e Discussão.....	128
7.3.1. <i>Aspectos gerais</i>	128
7.3.2. <i>Otimização.....</i>	129
7.3.2.1. <i>Quantificação de biodiesel em mistura com o diesel.....</i>	129
7.3.2.2. <i>Quantificação de biodiesel em mistura com óleos vegetais</i>	133
7.3.3. <i>Características analíticas.....</i>	134
7.4. Conclusões.....	137
8. Dispositivo microfluídico para a quantificação de biodiesel em mistura com o diesel	138
Resumo	138
Abstract.....	139
8.1 Introdução	140
8.2 Parte experimental.....	141
8.2.1 <i>Equipamentos e acessórios.....</i>	141
8.2.2 <i>Reagentes e soluções</i>	141
8.2.3 <i>Procedimento.....</i>	142
8.3. Resultados e Discussão.....	143
8.3.1. <i>Aspectos gerais</i>	143

8.3.2	<i>Otimização</i>	145
8.3.3	<i>Características analíticas</i>	153
8.4	Conclusões	157
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	158
	REFERÊNCIAS	160

APRESENTAÇÃO

A presente Tese foi redigida em 9 capítulos e descreve o desenvolvimento de procedimentos analíticos simples, confiáveis e que atendem aos requisitos da química verde para o controle de qualidade de biodiesel. Além disso, foram avaliadas estratégias de calibração para contornar efeitos de matriz e interferências. Os capítulos contemplam:

Capítulo 1: A importância do biodiesel na matriz energética mundial, e a necessidade do desenvolvimento de procedimentos analíticos alternativos verdes para controle de qualidade do biodiesel.

Capítulo 2: Objetivos geral e específicos da Tese.

Capítulo 3: O desenvolvimento de dois procedimentos explorando imagens digitais obtidas por *smartphone* para quantificar metanol em biodiesel, utilizando i) extração líquido-líquido e derivação química do analito e ii) um sistema para microdestilação de metanol do biodiesel.

Capítulo 4: O desenvolvimento do procedimento explorando imagens digitais obtidas por *smartphone* para quantificar Ca e Mg em biodiesel em um sistema de fase única, utilizando o etanol como solvente mediador.

Capítulo 5: A avaliação do procedimento MEC para contornar efeitos de matriz na quantificação espectrofotométrica de índice de iodo e glicerol livre em biodiesel.

Capítulo 6: A associação pioneira do procedimento MEC à DIP obtidas por *smartphone*, com viabilidade demonstrada pela quantificação de metanol na presença de um interferente

Capítulo 7: O desenvolvimento de um novo procedimento volumétrico para quantificar biodiesel em mistura com o diesel ou óleo vegetal, utilizando somente água e etanol.

Capítulo 8: O desenvolvimento de um dispositivo microfluídico para quantificar biodiesel em mistura com o diesel.

Capítulo 9: Considerações finais

Na primeira página dos capítulos 3 a 8 são apresentadas as referências dos artigos publicados, na forma de nota de rodapé.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biodiesel

O biodiesel é proveniente de fontes renováveis, óleos vegetais ou gorduras animais, sendo constituído majoritariamente por ésteres alquílicos. Usualmente é produzido pela transesterificação de triglicerídeos com metanol na presença de um catalisador homogêneo, hidróxido de sódio ou potássio. A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), por meio da Legislação 11097 introduziu, em 2005, o biodiesel na matriz energética brasileira, autorizando a adição de 2 %(v/v) de biodiesel ao diesel. Essa porcentagem aumentou gradativamente até 12 %(v/v), regredindo a 10 %(v/v) em 2022, devido à crise ocasionada pela pandemia do COVID-19 (1). O biodiesel tem grande importância na matriz energética brasileira, pois é produzido a partir de fontes renováveis e reduz significativamente a emissão de gases causadores do efeito estufa (e.g. dióxido de carbono), em comparação aos combustíveis fósseis (2).

Atualmente, a principal matéria-prima para a produção do biodiesel é o óleo de soja (ca. 72%), seguida de gordura animal (ca. 8%) e de outros materiais graxos de origem vegetal, como os óleos de algodão, palma e dendê, e aqueles oriundos de frituras (ca. 20%) (3). Os diferentes tipos de matérias-primas resultam em distintos ésteres alquílicos e podem alterar as características físico-químicas do biodiesel, como aumentar a viscosidade e a produção de goma. As diferenças mais significativas são observadas entre biodiesel produzido de óleos vegetais e aqueles oriundos de gordura animal. Alterações na composição e nas características do biodiesel podem afetar o desempenho do combustível, ocasionar danos ao motor e emitir gases tóxicos, como a acroleína (2), o que torna essencial o controle de qualidade desse biocombustível. Por outro lado, devido às diferenças de propriedades e composição química, efeitos de matriz podem ser observados em procedimentos analíticos (4–6), requerendo o desenvolvimento de procedimentos e estratégias de calibração que minimizem esses efeitos. Dentre os principais parâmetros a serem monitorados, estão os teores de água e éster, índices de acidez e de iodo e concentrações de glicerol (livre e total) e de metanol (Tabela 1) (7,8).

Tabela 1. Parâmetros de qualidade do biodiesel

Parâmetro	O que expressa	O que ocasiona	Limite-ANP
Índice de iodo	Grau de insaturação dos ésteres	Oxidação do biodiesel	Não estabelecido Anotar g I ₂ /100 g
Água e sedimentos	Impurezas e contaminantes sólidos	Reações com ésteres, crescimento microbiano, formação de sabão e entupimento de bico injetor	0,05 %(v/v) de água
Glicerol livre	Separação incompleta do subproduto após a transesterificação	Depósitos de carbono no motor e geração de substâncias tóxicas na combustão	0,02 %(m/m)
Glicerol total	Soma do glicerol livre e combinado, resultado da transesterificação incompleta	Depósitos de carbono no motor	0,25 %(m/m)
Índice de acidez	Presença de ácidos graxos livres	Corrosão do motor e de tanques de armazenamento	Equivalente a 0,5 g KOH/g
Metanol	Remoção incompleta do reagente	Redução de eficiência energética do biodiesel	0,20 %(m/m)
Teor de éster	Eficiência da reação de transesterificação	Redução de eficiência do biodiesel	≥ 96,5 %(m/m)

Adaptada de Knothe (8)

1.1.1. Procedimentos analíticos para o controle de qualidade de biodiesel

Diversos procedimentos analíticos têm sido desenvolvidos para o controle de qualidade de biodiesel, especialmente explorando técnicas cromatográficas e espectrométricas (9,10). Procedimentos alternativos também têm sido desenvolvidos visando superar algumas das limitações dos procedimentos oficiais (9,10). Entretanto, em sua maioria, os procedimentos alternativos, utilizam equipamentos de alto custo e/ou estratégias laboriosas para o preparo da amostra e são frequentemente sujeitos a efeitos de matriz (4,11).

A legislação brasileira não estabelece o limite máximo de índice de iodo em biodiesel, devendo apenas ser registrado o valor. A legislação europeia estabelece o valor máximo de 120 g I₂/100 g de biodiesel. Ambas as especificações recomendam o procedimento volumétrico (EN 14111), que requer reagente e solvente tóxico (reagente de Wijs e ciclohexano), além de ser um procedimento moroso e que gera volume significativo de resíduo: ca. 200 mL por análise (12).

Para a quantificação de água em biodiesel a legislação brasileira recomenda o método de titulação de Karl Fischer (EN ISO 12937), que é mais sensível do que o método baseado em centrifugação (ASTM 2709), recomendado pela norma (ASTM D6751). Embora o procedimento de Karl Fischer seja bem estabelecido, necessita de equipamento específico, controle rigoroso na manipulação da amostra e o uso de um reagente tóxico, composto de iodo, dióxido de enxofre e piridina (5,8).

A soma das concentrações de glicerol livre e combinado (mono, di e triglicerídeos) é denominada de glicerol total. A legislação brasileira recomenda os procedimentos para quantificação de glicerol total, baseados em cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID, do inglês *Gas chromatography with flame ionization detector*), prescrito pelas normas europeia (EN ISO 14106) e americana (ASTM D658) (8). Esses procedimentos são bem estabelecidos, mas requerem derivação química com o reagente N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida, em meio de piridina, além de necessitar de um equipamento custo relativamente alto (GC-FID). A legislação brasileira também recomenda para a quantificação de glicerol total o procedimento volumétrico (NBR 15344), baseado em iodometria. Entretanto, o procedimento é moroso e requer volume significativo de solvente tóxico (clorofórmio) (8).

Com relação ao índice de acidez, a legislação brasileira recomenda o procedimento ABNT NBR 14448 e os procedimentos indicados pelas normas americana (D664 e D974) e europeia (EN 14104). Esses se baseiam em titulação potenciométrica utilizando solução de KOH em meio orgânico, *i.e.* isopropanol (D974) ou etanol e tolueno (NBR 14448) como titulante e *p*-naftolbenzoina (D974) ou fenolftaleína (D664 e EN 14104) como indicadores. Os solventes tóxicos utilizados nesses procedimentos podem causar danos severos à saúde, além de serem inflamáveis (8).

A legislação brasileira recomenda o procedimento baseado em GC-FID (EN ISO 14110) para quantificar o metanol em biodiesel, que além de utilizar um equipamento de alto custo, requer a extração do analito e leva mais de 50 min por análise (8).

Os ésteres de alquila são as espécies características do biodiesel e sua quantificação indica a eficiência da reação de transesterificação e da purificação do biocombustível (13). Assim, o teor de ésteres é um dos principais parâmetros a serem monitorados no controle de qualidade de biodiesel. A legislação brasileira recomenda

o procedimento baseado em GC-FID (EN ISO 14103), aplicável somente a biodiesel oriundo de óleos de soja, pois utiliza heptadecanoato de metila como padrão interno, espécie encontrada em quantidades significativas em biodiesel produzido de gordura animal. Para a análise de biodiesel oriundo de gordura animal, óleo de mamona e de misturas de outros óleos, recomenda-se o procedimento baseado em GC-FID (NBR 15342), que utiliza nonadecanoato de metila como padrão interno (14).

No Brasil, o biodiesel é comercializado misturado ao diesel e, diante disso, é necessário monitorar a quantidade do biocombustível adicionada ao diesel, visando inibir fraudes, como a adição de quantidades menores que as estabelecidas pela legislação vigente ou até mesmo a adição de óleo vegetal em substituição ao biodiesel. O procedimento EN 14078/2009 é baseado em espectroscopia na região do infravermelho médio (MIR, do inglês *Mid infrared*) (15). Embora já sejam comercializados espectrômetros de infravermelho portáteis e de baixo custo, esse procedimento requer um banco de dados com muitas amostras de referência para construção do modelo de calibração, e o tratamento desses dados é trabalhoso e usualmente requer quimiometria (16).

Da discussão apresentada anteriormente, conclui-se que alguns dos procedimentos oficiais para controle de qualidade de biodiesel utilizam equipamentos caros (12,14,15), são morosos e requerem solventes tóxicos. Diante disso, vêm sendo desenvolvidos métodos e procedimentos alternativos que são mais práticos e rápidos e/ou utilizam equipamentos de baixo custo, além de consumirem pequenas quantidades de reagentes e solventes. Entretanto, devido à variedade de matérias-primas utilizadas para a produção do biodiesel, alguns procedimentos necessitam de estratégias laboriosas para contornar efeitos de matriz. Dessa forma, estratégias devem ser avaliadas visando minimizar esse problema.

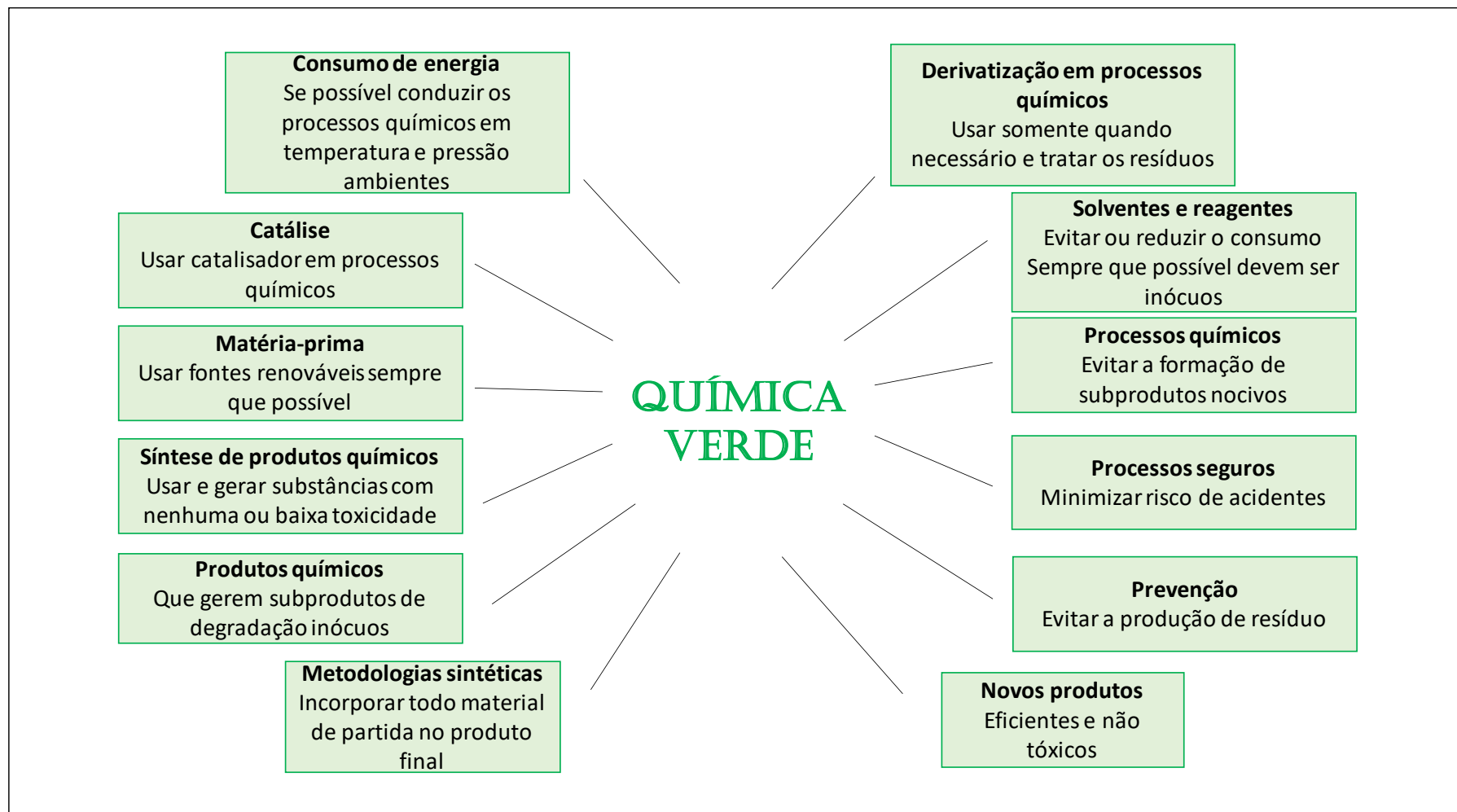
1.2. Química analítica verde

Diversos termos são utilizados para definir processos químicos que são realizados de maneira ecologicamente correta, dentre os mais usuais estão, química verde (*Green chemistry*), química limpa (*Clean chemistry*), química sustentável (*Sustainable chemistry*) ou química ambientalmente amigável (*Environmental friendly chemistry*). A química verde engloba todas as áreas da química, tendo como objetivo atender às exigências ambientais e considerações ecotoxicológicas, reduzir o

consumo de energia e a geração de resíduos e aumentar e estimular o uso de matérias-primas oriundas de fontes renováveis. A partir dos 12 princípios da Química verde, definidos por Anastas (17) e ilustrados na Figura 1 (18,19), foram definidos os 12 princípios da química analítica verde (GAC, do inglês *Green analytical chemistry*) (Figura 2) (20).

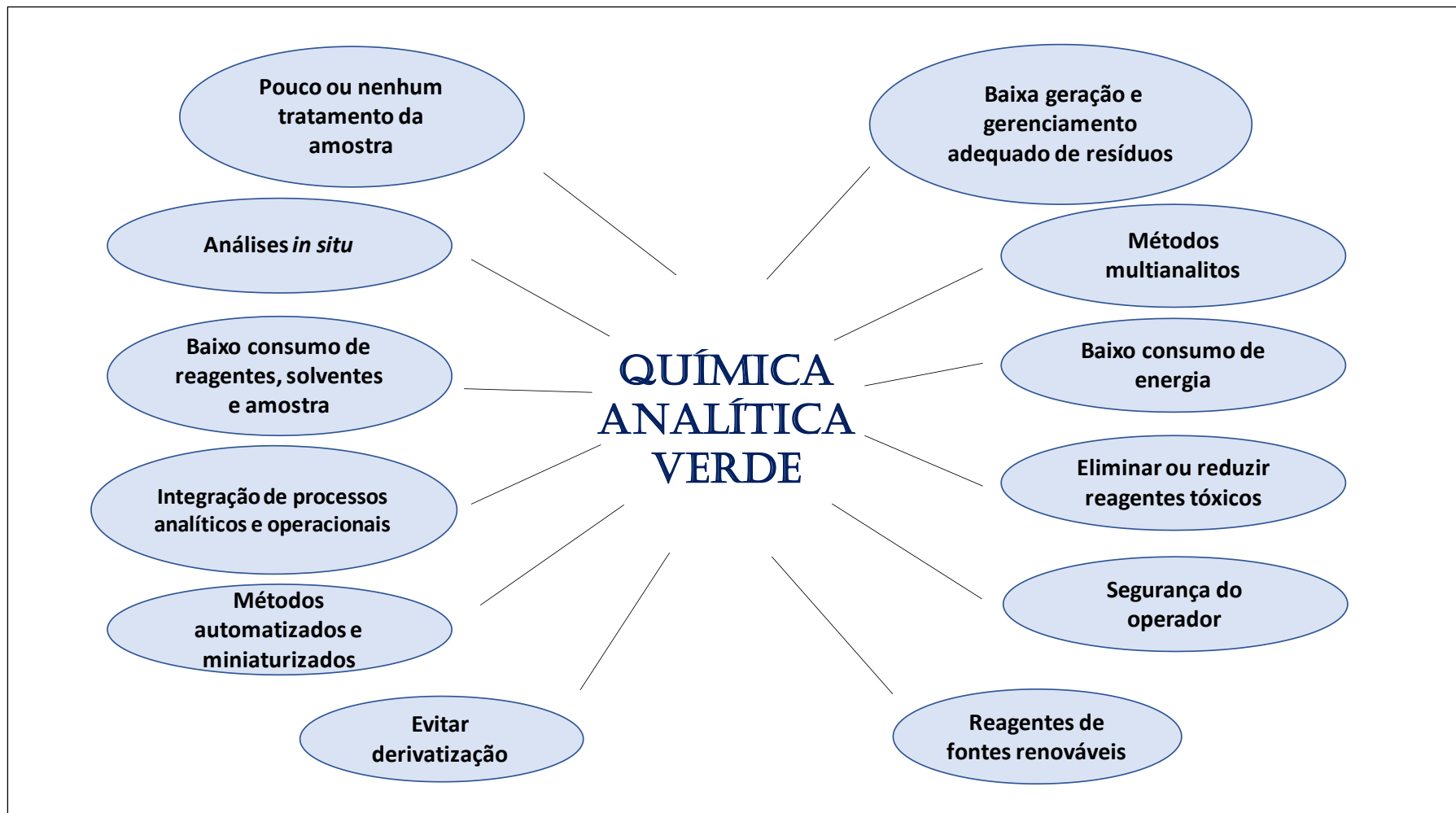
A química analítica verde visa o desenvolvimento de métodos e procedimentos analíticos que visam a saúde e segurança do operador, baixo consumo de reagentes, solventes e energia, e/ou que permitam análises *in situ*, *i.e.* no próprio local em que há a demanda analítica (21–23). Procedimentos usando dispositivos microfluídicos (24,25), sensores eletroquímicos (26,27), análises em fluxo (13,28) e *spot tests* (29,30) têm sido explorados para atender os requisitos da química verde (31). Entretanto, alguns desses procedimentos necessitam de pré-concentração do analito ou separação da matriz. Os procedimentos tradicionais de preparo de amostra geralmente demandam de várias etapas, muitas vezes com alto consumo de solventes tóxicos. Diante disso, visando atender aos requisitos da química verde e diminuir a morosidade dos procedimentos de preparo de amostras, diferentes estratégias vêm sendo exploradas, como extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid phase extraction*) (32), com membranas (33) e microextração líquido-líquido (28,34).

Procedimentos analíticos que atendem aos requisitos da química verde foram desenvolvidos para o controle de qualidade de biodiesel (2,9,10), como o *spot test* para a quantificação de índice de iodo (29) e os procedimentos para a quantificação do índice de acidez (35) e teor de água (5), utilizando análises em fluxo. Essas alternativas têm grande potencial para monitorar outros parâmetros de qualidade do biodiesel, o que motivou o projeto que originou essa Tese.

Figura 1. Os 12 princípios da química verde

Adaptada de Lenardão, Dabdoub, Batista (18) e Erythropel *et al.* (19)

Figura 2. Os 12 princípios da química analítica verde



Adaptada de Gałuszka, Migaszewski, Namieśnik (20)

1.3. Fotometria por imagens digitais obtidas por *smartphone*

Com o constante avanço das tecnologias empregadas, as câmeras dos *smartphones* tornaram-se uma ferramenta muito atrativa para aplicações analíticas (36–39). Essa ferramenta destaca-se devido à instrumentação amplamente acessível, custo relativamente baixo e à portabilidade (36–39), e vem sendo explorada com sucesso em diferentes áreas como, por exemplo, para o controle de qualidade de alimentos (40–42), combustíveis (29,43) e análises clínicas (44,45). Paralelamente ao uso de câmeras de *smartphones*, busca-se simplificar os procedimentos analíticos, fornecer alternativas para análises de rotina e/ou *in situ* (38,46) e, frequentemente, minimizar as quantidades de reagentes consumidas. As medidas analíticas são usualmente baseadas na absorção de radiação no visível, envolvendo a medida da intensidade da radiação refletida (47). Embora menos usuais, há também aplicações baseadas em fluorescência (48) e quimiluminescência (49).

As imagens digitais são normalmente capturadas sob iluminação constante e controlada, fornecida por uma fonte de luz branca e, menos comumente, um diodo emissor de luz (LED), que assegura emissão de radiação em uma faixa relativamente estreita do espectro visível (50). Posteriormente, são extraídas das imagens os valores dos canais dos sistemas de cores, por exemplo: RGB (do inglês, *Red, Green, Blue*), CMY (do inglês *Cyano, Magenta, Yellow*), HSV (do inglês *Hue, Saturation, Value*), Lab, XYZ ou Grayscale (Figura 3), usando aplicativos específicos, como aqueles de acesso livre, e.g. Colorgrab[®] (51–53), Photometrix[®] (54) e ColorLab[®] (55). Alguns softwares também têm sido utilizados, como ImageJ[®] (56,57) e ColorMine[®] (58).

1.3.1. Sistemas de cores

O sistema de cores RGB (Figura 3), que predomina em aplicações analíticas (59), foi utilizado na maioria das aplicações descritas nesta Tese. Esse sistema mimetiza a visão humana, explorando os componentes vermelho, verde e azul para reproduzir o espectro eletromagnético visível. Em uma representação vetorial, (0,0,0) representa a absorção total da radiação incidente, enquanto (255,255,255) refere-se hipoteticamente à reflexão total da radiação incidente,

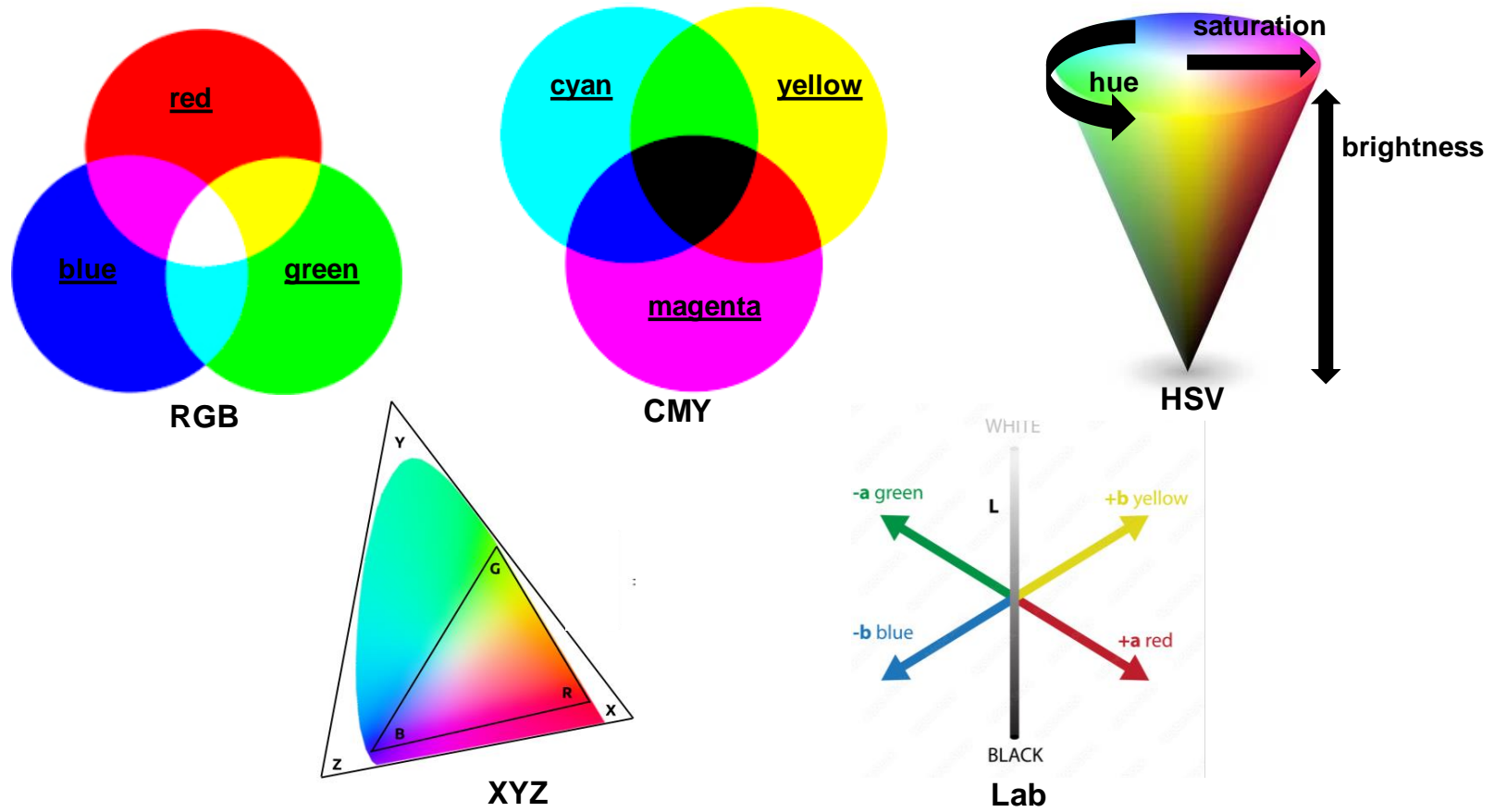
i.e. ausência de absorção de radiação (60–62). Assim, o sistema de cores RGB pode representar ca. 16,7 milhões de cores (256^3). Em algumas aplicações, a escala RGB é normalizada para o intervalo 0-1 para tratamento de dados (63).

A escolha do canal RGB a ser utilizado como parâmetro analítico é baseada na cor complementar das espécies absorventes. Por exemplo, respostas nos canais R, G ou B são usadas quando as espécies absorventes possuem cor azul (64), violeta (65) e vermelha (66), respectivamente. Usualmente, o espectro de absorção do produto é sobreposto à região espectral coberta por mais de um canal de medida e a escolha do canal geralmente visa maximizar a sensibilidade (67), mas também deve se considerar a seletividade (68). A combinação de canais de medida também pode ser explorada para maximizar a sensibilidade ou para fornecer mais informações analíticas (41).

A escala de cinza (*grayscale*) é a abordagem mais simples e amplamente usada para processamento rápido de imagens. Ele correlaciona a intensidade da cor com um tom de cinza, descrita como um valor de 0 (preto) a 255 (branco) do sistema RGB como componente. Embora a escala de cinza forneça menos informações que o sistema RGB, deve-se lembrar que a maioria das aplicações analíticas se restringe às variações da intensidade da cor medida em um único canal, o que equivale à escala de cinza. Exemplos de aplicações da escala de cinza incluem a quantificação de pesticida em água (69), a identificação da origem geográfica e o tipo de uva para a avaliação da autenticidade de vinho tinto (70), detecção de adulteração no teor de gordura de hambúrgueres de frango (71) e avaliação do frescor do espinafre (72).

O sistema de cores CMY (Figura 3) é formado pela adição de duas cores do sistema RGB e as coordenadas correspondentes à reflexão (0,0,0) e absorção total (1,1,1), respectivamente. O canal do sistema CMY a ser utilizado como parâmetro analítico é definido pela composição da cor observada, por exemplo, canais M e Y são usados para medidas de espécies com predominância de magenta (73) e amarelo (69,74).

Figura 3. Ilustração dos sistemas de cores RGB, CMY, HSV, XYZ e Lab



Adaptada de Fan *et al.* (75)

Matiz, saturação e valor são a base do sistema HSV (Figura 3), que representa as cores em um ângulo de 360 graus (H), sua intensidade como saturação (S) e brilho como valor (V) (61,62,75). Os valores de reflexão total e absorção total correspondem a (360, 1, 1) e (0, 0, 0), respectivamente. O sistema HSV é preferido para monitorar transições entre duas cores (76), como exemplificado pela avaliação da autenticidade de óleos comestíveis usando o canal H (77) e do grau de amadurecimento de frutas explorando os canais H e S (78). O canal H também foi explorado para quantificação de albumina em urina (79) e vancomicina em medicamentos (80).

O sistema X, Y e Z (Figura 3), é utilizado para representar todas as cores do espectro visível em uma representação tridimensional. Por exemplo, os canais XYZ foram explorados em conjunto para avaliar as mudanças de cor de frutos durante o amadurecimento (81) e para a quantificação de clorofila em óleos de oliva e abacate (82). O canal Y também foi explorado para a quantificação do conteúdo de carotenoides nesses óleos (82).

O sistema de cores Lab (anteriormente chamado de CIE-Lab) imita a percepção humana das cores da imagem usando a luminosidade (L) da cor, que varia de 0 a 100, e os parâmetros a e b para representar as mudanças de cores de vermelho para verde e de amarelo a azul (Figura 3), com intervalos variando de -120 a 120 (61,62,75). O sistema Lab foi explorado com sucesso para classificar o frescor do espinafre (72), quantificar o teor de antocianina monomérica total em arroz preto por medidas em diferentes pH (83), avaliar a cor de alimentos (84) e para quantificar formaldeído em frutos do mar (85). O sistema Lab também já foi explorado usando o método de classificação Support vector machine (SVM) para detecção de doença periodontal (86).

1.3.2. Aquisição de imagens digitais

Para obter resultados confiáveis e facilitar a reprodução dos procedimentos analíticos, alguns parâmetros devem ser ajustados e controlados para a aquisição de imagens digitais por câmeras de *smartphones*. A distância da câmera do *smartphone* do objeto (às vezes chamada de distância de captura), a região de interesse (ROI, do inglês *Region of interest*), as condições de iluminação e a abertura da lente da câmera podem afetar os resultados. Por exemplo, a ausência de iluminação controlada (43,87) e distância inadequada da câmera ao objeto (88) pode prejudicar a sensibilidade, a

precisão e a linearidade, enquanto a iluminação excessiva pode dificultar a detecção de mudanças sutis na cor (75), reduzindo assim a sensibilidade. A abertura de lente é um parâmetro que também afeta a linearidade e a sensibilidade (43). Embora os valores de ROI possam limitar a faixa linear e afetar a precisão em algumas aplicações, principalmente quando sistemas heterogêneos estão envolvidos, este parâmetro não é crítico para a maioria das aplicações, que dependem de sistemas homogêneos.

1.3.3. *Processamento de dados*

Embora seja essencial para obter resultados confiáveis, o processamento de dados não é padronizado em procedimentos analíticos envolvendo fotometria por imagens digitais (DIP, do inglês *Digital-image photometry*). A escolha do processamento de dados depende primeiro do sistema de cores que será utilizado. Por exemplo, o sistema RGB se refere às cores complementares das espécies absorventes. Dessa forma, a intensidade da radiação refletida é inversamente proporcional à intensidade da cor e, portanto, à concentração das espécies. Uma resposta analítica (AR) diretamente proporcional à concentração do analito é então obtida subtraindo o sinal obtido para amostra/padrões do valor referente ao branco analítico (Eq. 1) (53,60) ou de 255 (Eq. 2) (66,68), valor correspondente à absorção total da radiação. Os valores obtidos para a amostra e o branco analítico são representados por s e b , respectivamente.

Diferentemente da espectrofotometria no ultravioleta no visível, (UV-Vis, do inglês *Visible ultraviolet*), em muitas aplicações são obtidas relações lineares entre a intensidade da radiação refletida e a concentração da espécie absorvente. De qualquer forma, a conversão dos valores medidos para refletância, conforme exemplificado para os canais R, G e B na Eq. 3, também é amplamente explorada em DIP (47,89). Esse processamento está de acordo com o previsto pela lei de Beer e, às vezes, fornece respostas mais lineares em função da concentração da espécie absorvente (47).

$$AR = R_b - R_s \text{ ou } G_b - G_s \text{ ou } B_b - B_s \quad (1)$$

$$AR = 255 - R_s \text{ ou } 255 - G_s \text{ ou } 255 - B_s \quad (2)$$

$$AR = -\log \frac{R_b}{R_s} \text{ ou } -\log \frac{G_b}{G_s} \text{ ou } -\log \frac{B_b}{B_s} \quad (3)$$

Outras abordagens para processamento de dados, envolvem a combinação de dois canais (Eq. 4) (41) ou o uso de vetorial (Eq. 5) (41,90). Ambos visam aumentar a sensibilidade somando as respostas medidas em diferentes canais, seja explorando um produto com banda larga de absorção (68) ou a soma das respostas do reagente e produto (91) e (e.g., as formas conjugadas de um indicador ácido-base (41)).

$$AR = |(G_b - G_s) - (B_b - B_s)| \quad (4)$$

$$AR_{vetor} = \sqrt{(R_s - R_b)^2 + (G_s - G_b)^2 + (B_s - B_b)^2} \quad (5)$$

Aplicações baseadas em sistemas de escala de cinza (74) ou cores CMY (74) geralmente exploram estratégias simples para normalizar a resposta analítica (92), conforme ilustrado na Eq. 6. Na equação 6, V é referente ao valor medido para a escala de cinza ou para os canais C, M, Y, respectivamente.

$$AR = \left[\frac{(V_s - V_b)}{V_b} \right] * 100\% \quad (6)$$

Com base no sistema HSV, também foi explorada a normalização da resposta analítica (FHSV) da saturação (S) em função dos valores de matiz (H) e brilho (V), (Eq. 7) (93).

$$HSV = \left(\frac{S}{H} \right) + \left(\frac{S}{V} \right) \quad (7)$$

Mais recentemente, análise multivariada tem sido aplicada à DIP, por exemplo, para minimizar os efeitos de matriz. Um exemplo é a aplicação de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR, do inglês *Partial least squares regression*) (94,95) ou do método de classificação SVM (94).

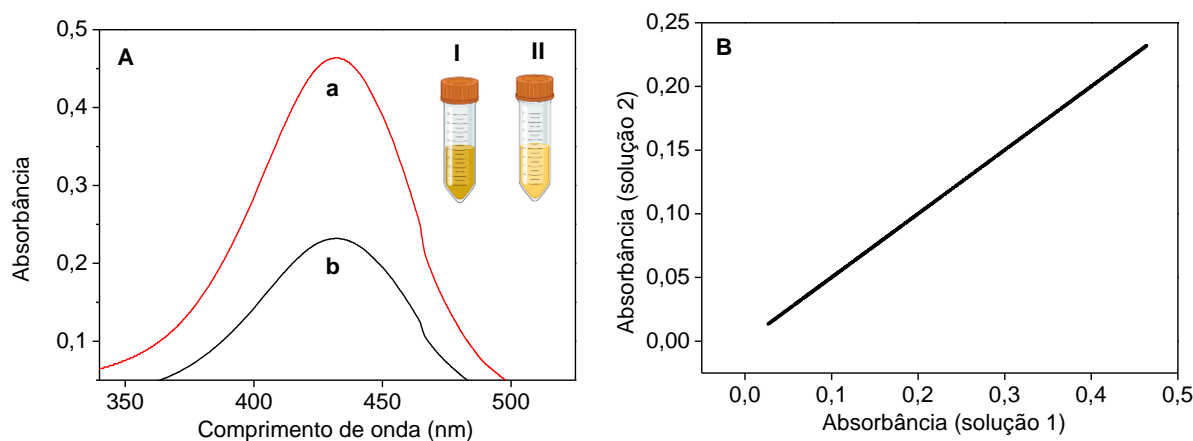
1.4. Calibração Multi-energia

Novas estratégias de calibração têm sido propostas para superar efeitos de matriz e para agilizar a obtenção de resultados analíticos. Nesse contexto, destaca-se uma estratégia recente, denominada *multi-energy calibration* (MEC) (96), cuja tradução adotada nessa tese foi “calibração multi-energia”. Enquanto no método de calibração externa, usual na maioria dos procedimentos analíticos, em que é fixado o comprimento de onda de máxima absorção/emissão e variada a concentração do analito, na estratégia MEC é fixada a concentração do analito e obtido o sinal analítico em diferentes comprimentos de onda. Desse aspecto deriva o termo “*multi-energy*”, já que a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda.

Como vantagem em relação aos procedimentos tradicionais, o MEC necessita de apenas duas soluções de calibração, sendo uma composta pela amostra em mistura com uma solução padrão, e.g. 50 %(v/v) (solução 1) e a outra contendo a mesma fração volumétrica da amostra que a solução 1, misturada a um diluente (solução 2). Um gráfico dos sinais analíticos obtidos para a solução 1 em função daqueles obtidos para a solução 2, em diferentes comprimentos de onda, deve ser linear e permitir a quantificação do analito (C) na amostra a partir do coeficiente angular (CA) e da concentração do analito na solução do padrão adicionado à solução 1 (Cs), Eq. 8 (96). A estratégia MEC é ilustrada na Figura 4.

$$C = \frac{(CA \times Cs)}{(1-CA)} \quad (8)$$

Figura 4. Aplicação da estratégia MEC. (A) espectros de absorção das soluções (a) 1 (amostra + padrão), imagem I e (b) 2 (amostra + diluente), imagem II. (B) Curva de calibração MEC



Essa estratégia de calibração gerou bons resultados quando aplicada utilizando vários procedimentos de espectrometria atômica, como à quantificação de Cr, Cu e Ni em amostras de matrizes complexas explorando espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES, do inglês *Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*) e espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES, do inglês *Microwave-induced plasma optical emission spectroscopy*) (96). O procedimento baseado em MIP OES e a estratégia MEC foram também utilizados para quantificar As, Ba, Cd, Cr e Pb em amostras de fertilizantes (97). Essa estratégia também foi explorada com sucesso à quantificação de Ca, K e Mg (98) e silício (99), utilizando a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS, do inglês *Laser-induced breakdown spectroscopy*). O conceito do MEC foi expandido para espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS, do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry*) (100) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e configuração tandem (ICP-QMS/QMS, do inglês *Inductively coupled plasma tandem mass spectrometry*) (101), originando os procedimentos de calibração multi-isótopos e multi-espécies, respectivamente. Recentemente, a estratégia MEC foi explorada em espectroscopia molecular no UV-Vis e fluorescência, utilizando analitos modelo (102), e o potencial para contornar efeito de matriz na análise de biodiesel, particularmente na quantificação de índice de iodo (4) e de glicerol livre (6), foi demonstrado nesta Tese.

2. OBJETIVOS

Visando superar dificuldades no controle de qualidade de biodiesel e da mistura biodiesel:diesel, o objetivo geral desta Tese foi o desenvolvimento de procedimentos analíticos práticos, menos suscetíveis a efeitos de matriz, com reduzido consumo de reagentes e solventes. Os objetivos específicos foram desenvolver:

- (1) Procedimento explorando fotometria por imagens digitais obtidas por um *smartphone* para quantificar metanol em biodiesel;
- (2) Procedimento explorando um microdestilador construído no laboratório para a separação do metanol do biodiesel e detecção por fotometria por imagens digitais obtidas por um *smartphone*;
- (3) Procedimento baseado em fotometria por imagens digitais obtidas por um *smartphone* e um sistema de fase única para a quantificação de Ca e Mg em biodiesel obtido de diferentes matérias-primas;
- (4) Estratégia de calibração multi-energia em espectrofotometria molecular para contornar efeitos de matriz na quantificação de índice de iodo e de glicerol livre em biodiesel oriundo de diferentes matérias-primas;
- (5) Estratégia de calibração multicanal baseada em imagens digitais obtidas com a câmera de um *smartphone* para corrigir a interferência de glicerol na quantificação de metanol em biodiesel;
- (6) Procedimento volumétrico explorando a diferença de solubilidade de biodiesel e diesel (ou óleo vegetal) em etanol/água para a quantificação de biodiesel em mistura com o diesel ou óleo vegetal;
- (7) Dispositivo microfluídico explorando fotometria por imagens digitais obtidas com a câmera de um *smartphone* para quantificar biodiesel em misturas com diesel.

3. Quantificação de metanol em biodiesel^{1 2}

Resumo

As normas brasileira, americana e europeia recomendam o procedimento baseado em cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID, do inglês *Gas chromatography with flame ionization detector*) para a quantificação de metanol em biodiesel, o que dificulta o controle de qualidade devido ao custo e eventual não disponibilidade do equipamento. Nesse contexto, essa etapa da Tese objetivou o desenvolvimento de procedimentos simples e de baixo custo, baseados em fotometria por imagens digitais (DIP do inglês, *Digital-image photometry*), para a quantificação de metanol em biodiesel. Nesse sentido, foram avaliadas duas estratégias. O primeiro procedimento baseou-se na oxidação do metanol a formaldeído e posterior reação com o reagente de *Schiff*, resultando em um produto violeta. O segundo procedimento consistiu na microdestilação do metanol do biodiesel e absorção do analito no estado gasoso em uma solução aceptora (KMnO_4), ocasionando a descoloração dessa solução pela oxidação do metanol a formaldeído. Em ambos os procedimentos foi utilizado um *smartphone* e um aplicativo de acesso livre para a aquisição das imagens digitais e obtenção das respostas analíticas no sistema RGB. As medidas foram baseadas na intensidade de radiação refletida medida no canal G, por ser a cor complementar dos produtos de medida. Para o procedimento que utilizou o reagente de *Schiff*, respostas lineares foram obtidas nas faixas 20–500 mg kg⁻¹ (600 µL de amostra) e 500–2000 mg kg⁻¹ metanol (150 µL de amostra), descritas pelas equações: $S = 69 + 0,246C$ ($r = 0,995$) e $S = 67 + 0,088C$ ($r = 0,997$), respectivamente. O CV ($n = 10$) e o LD (nível de confiança de 99,7%) foram estimados em 5,0% e 10 mg kg⁻¹, respectivamente. O procedimento requer apenas 3 mg de KMnO_4 , 9 mg de ácido oxálico, 1,5 mg de p-rosanilina e gera ca. 1,4 mL de resíduo por quantificação. Utilizando a microdestilação, a eficiência de transferência do metanol para a solução aceptora foi estimada em $98 \pm 3 \%$ e a seletividade é conferida pela separação do metanol, que é a espécie mais volátil na amostra. Resposta linear foi obtida entre 250–2000 mg kg⁻¹, descrita pela equação: $S = 24 + 403C$ ($r = 0,982$). O CV ($n = 10$) e LD (nível de confiança de 99,7%) foram estimados em 3,7% e 90 mg kg⁻¹, respectivamente. O procedimento requer 4 µg de KMnO_4 e gera somente 950 µL de resíduo por quantificação. Os resultados obtidos pelos procedimentos propostos foram concordantes com o procedimento de referência baseado em GC-FID com 95% de confiança. As propostas apresentadas são alternativas eficientes e de baixo custo para a quantificação de metanol em biodiesel.

Palavras-chave: Álcool. Biocombustível. Transesterificação.

¹ SOARES, S.; TORRES, K. G; PIMENTEL, E. L.; MARTELLI, P.B.; ROCHA, F. R. P. A novel spot test based on digital images for determination of methanol in biodiesel. *Talanta*, v 195, p. 229–235, 2019.

² SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. A simple and low-cost approach for microdistillation: Application to methanol determination in biodiesel exploiting smartphone-based digital images. *Talanta*, v. 199, p. 285–289, 2019.

Abstract

Brazilian, American, and European regulations recommend the procedure based on GC-FID to quantify methanol in biodiesel, which is hindered by the equipment costs and its eventual unavailability. In this context, two simple and low-cost procedures based on DIP were developed for the quantification of methanol in biodiesel. The first procedure was based on the oxidation of methanol to formaldehyde and subsequent reaction with the Schiff reagent, resulting in a violet product, whereas the second one exploited microdistillation of methanol from biodiesel, absorption of the gaseous analyte in a potassium permanganate acceptor solution, and oxidation to formaldehyde, thus causing solution discoloration. For both procedures, a smartphone camera and an open access application were used for acquiring the digital images and obtaining the corresponding RGB values. Measurements were based on the intensity of reflected radiation and the G channel of the complementarity with the color of the reaction products. For the first procedure, linear responses were obtained within 25–500 mg kg⁻¹ (600 µL of sample) and 500–2000 mg kg⁻¹ (150 µL of sample), as described by the equations: $S = 69 + 0.246C$ ($r = 0.995$) and $S = 67 + 0.088C$ ($r = 0.997$), respectively. The CV ($n = 10$) and the LD (99.7% confidence level) were estimated at 5.0% and 10 mg kg⁻¹, respectively. The procedure requires as low as 3 mg of potassium permanganate, 9 mg of oxalic acid and 1.5 mg of p-rosaniline and generates ca. 1.4 mL of waste per analysis. In the second procedure, the efficiency of methanol microdistillation was estimated in $98 \pm 3\%$ and the separation of the gaseous species improved selectivity, as methanol is the most volatile species in the sample. A linear response was obtained within 250–2000 mg kg⁻¹ ($r = 0.982$). The CV ($n = 10$) was estimated as 3.7% with an LD (99.7% confidence level) of 90 mg kg⁻¹. The procedure requires 4 µg of potassium permanganate and generates only 950 µL of waste per analysis. The proposed and reference (GC-FID) procedures yielded results in agreement at the 95% confidence level. The proposals are reliable, practical, and cost-effective alternatives for the quantification of methanol in biodiesel.

Keywords: Alcohol. Biofuel. Transesterification.

3.1. Introdução

O metanol é utilizado em excesso no processo de produção do biodiesel para aumentar o rendimento da reação de transesterificação. Diante disso, a quantidade remanescente é um importante parâmetro a ser monitorado, pois concentrações superiores a 2000 mg kg^{-1} reduzem a eficiência do biocombustível (7). O procedimento oficial para quantificar metanol em biodiesel é baseado em GC-FID, que requer um tempo de análise (ca. 50 min) (103) e utiliza um equipamento de alto custo. Alguns procedimentos alternativos ao procedimento oficial têm sido descritos na literatura, como os que utilizam a extração do metanol com membranas permeáveis e detecção voltamétrica (104) ou espectrofotométrica (105). Estratégias utilizando microextração por *headspace* em fase sólida (SPME, do inglês *Solid phase microextraction*) e baseados em GC-FID foram desenvolvidas (11), entretanto, são procedimentos que têm um alto custo agregado, considerando o equipamento e consumíveis, incluindo os reagentes necessários (11,105).

Devido ao aumento da produção do biodiesel e da variedade de matérias-primas utilizadas para sua produção é necessário o desenvolvimento de procedimentos analíticos mais rápidos, simples, baratos e que permitam análises *in situ*, *i.e.* diretamente nas usinas de produção de biodiesel, bem como em pontos de fiscalização. Alguns procedimentos com essas características foram desenvolvidos para o controle de qualidade de biodiesel, como o *spot test* em papel para quantificar índice de iodo (29), procedimento em frasco único (4) para quantificar índice de iodo e glicerol (6) e análises em fluxo para quantificar água (5), índice de acidez (35) e o teor de éster ou de biodiesel na mistura com o diesel (13). Entretanto, não há procedimento para quantificar metanol em biodiesel que atende aos requisitos supracitados.

Neste contexto, visando simplificar a quantificação de metanol em biodiesel, propôs-se desenvolver procedimentos explorando DIP obtidas por *smartphone*.

3.2. Parte experimental

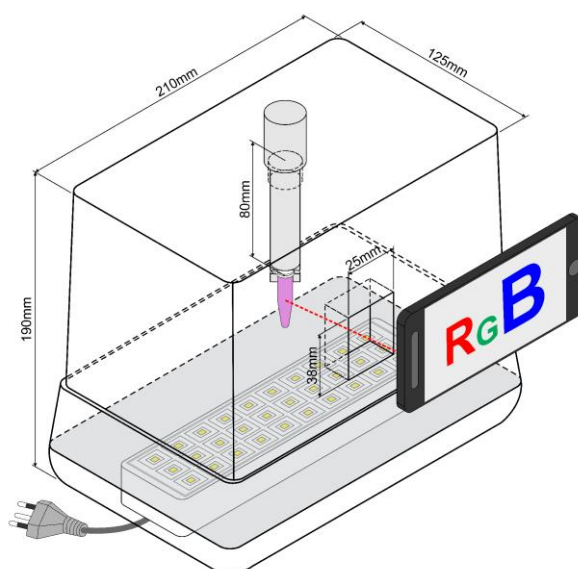
3.2.1. Procedimento analítico explorando extração líquido-líquido e derivação química para quantificar metanol em biodiesel

3.2.1.1. Equipamentos e acessórios

Foram utilizados tubos Eppendorf® de 1,5 mL e Falcon® de 15 mL, centrífuga (Quimis, modelo 6222T108) e agitador de tubos do tipo vortex (Nova Instruments). Os espectros de absorção UV-Vis foram adquiridos com espectrofotômetro multicanal (Ocean Optics®, EUA) com uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

As imagens digitais foram obtidas utilizando um Iphone (SE) com câmera de 8 megapixels com abertura de lente de f/2.2 e aplicativo PhotoMetrix® 1.1.1 (106). As medidas fotométricas foram realizadas sob iluminação controlada, utilizando-se uma câmara construída em isopor, com 190 × 210 × 125 mm de altura, comprimento e largura, coberta internamente com papel branco e com uma lâmpada LED (30 LEDs SMD SLIM, luz branca, intensidade luminosa de 50 lux) acoplada ao fundo, Figura 5. Para a aquisição das imagens, a câmera do celular foi posicionada a 5,0 cm do tubo Eppendorf®.

Figura 5. Representação da câmara construída em isopor para as medidas fotométricas



3.2.1.2. Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água deionizada (resistividade > 18,2 M Ω cm), em balões volumétricos de 100 mL.

O reagente de *Schiff* foi preparado utilizando 0,30 g de p-rosanilina, 0,65 g de metabissulfito de sódio e 5 mL de H₂SO₄ concentrado e avolumado com água deionizada. Essa solução foi armazenada por 12 h e filtrada antes do uso. A solução de KMnO₄ 190 mmol L⁻¹ foi preparada dissolvendo 3,00 g do sal em 15,5 mL de H₃PO₄ concentrado e foi completado para 50 mL com água deionizada. A solução de ácido oxálico 400 mmol L⁻¹ foi preparada dissolvendo 5,00 g do reagente em 100 mL de H₂SO₄ 9 mol L⁻¹. Foram preparadas soluções de metanol e glicerol com concentrações de 10–2000 mg kg⁻¹ e 0,2–1,0 g L⁻¹ em água deionizada.

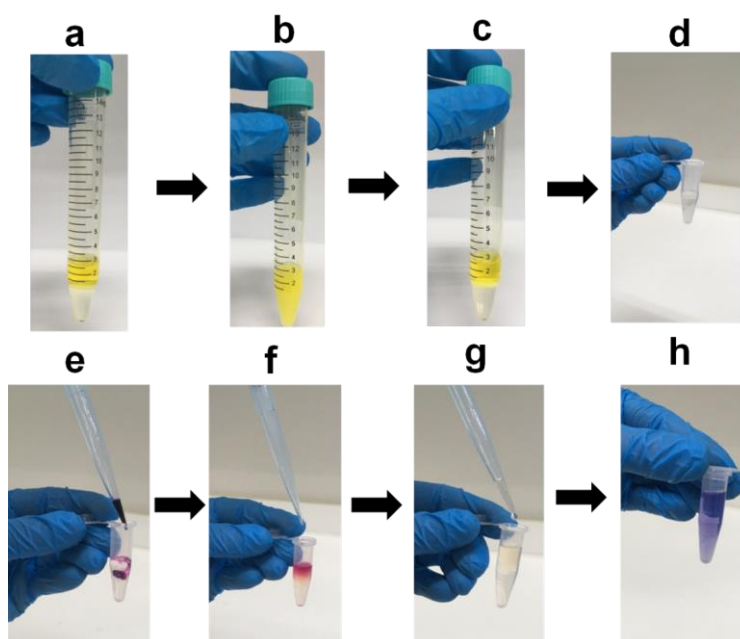
Para a avaliação de exatidão do procedimento, foram obtidas amostras de biodiesel diretamente de usinas produtoras, acompanhadas por certificados de análise e dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pela ANP.

3.2.1.3. Procedimento

A extração líquido-líquido do metanol foi realizada em tubo Falcon[®] de 15 mL, adicionando 1,5 mL de biodiesel e 1,5 mL de água deionizada (Figura 6a). A mistura foi agitada por 20 min para extração do metanol para a fase aquosa (Figura 6b), seguida de centrifugação por 2 min para separação das fases aquosa e orgânica (Figura 6c). A fase aquosa contendo o metanol foi removida com uma micropipeta de 1 mL e a derivação química do analito foi realizada em um tubo Eppendorf[®] de 1,5 mL, adicionando 150 μ L ou 600 μ L do extrato aquoso ou solução padrão (Figura 6d) e 25 μ L da solução de KMnO₄ em meio ácido (Figura 6e), seguida de agitação manual. Após 5 min, para a oxidação do metanol a formaldeído, 120 μ L de solução de ácido oxálico foi adicionada para consumir o excesso de KMnO₄ (Figura 6f) e, após 1 min, 500 μ L do reagente de *Schiff* foi adicionado (Figura 6g), seguido de homogeneização manual. Depois de 20 min, para a formação do produto (Figura 6h), as medidas fotométricas foram realizadas diretamente nos tubos Eppendorf[®].

Todas as medidas foram realizadas em triplicata e o sinal analítico (S) foi obtido subtraindo os valores do canal G do valor de 255, referente à reflexão total de radiação, obtendo-se assim valores proporcionais à intensidade de cor do produto de medida.

Figura 6. Etapas do procedimento de extração de metanol e formação do produto de medida: a) biodiesel (fase superior) + água, b) mistura após agitação, c) separação de fases, d) fase aquosa contendo o metanol, e) adição de KMnO_4 , f) adição de ácido oxálico, g) adição do reagente de *Schiff* e h) produto formado



3.2.2. Procedimento analítico explorando microdestilação para quantificar metanol em biodiesel

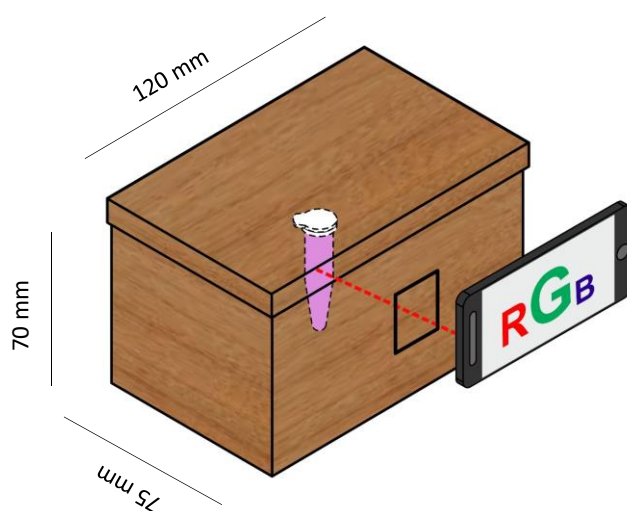
3.2.2.1. Equipamentos e acessórios

O sistema de microdestilação desenvolvido consiste de um tubo Eppendorf® de 1,5 mL (com a solução aceptora), suspenso no interior de um tubo Falcon® de 50 mL (com a amostra). A microdestilação foi realizada usando um banho de água, aquecido em uma chapa (Tecnal, modelo TE-0851). As imagens digitais foram adquiridas com um Iphone (SE) equipado com uma câmera de 8 megapixels com abertura de lente de f/2.2, e os valores de RGB foram obtidos utilizando o aplicativo PhotoMetrix®1.1.1 (106). As medidas fotométricas foram realizadas sob iluminação controlada utilizando

uma câmara de madeira com dimensões de 70 x 120 x 75 mm de altura, comprimento e largura, respectivamente (Figura 7). O celular foi posicionado a 5,0 cm dos tubos contendo a solução aceptora.

Os espectros de absorção UV-Vis foram adquiridos com espectrofotômetro multicanal (Ocean Optics®, EUA) com uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

Figura 7. Representação da câmara construída em madeira para as medidas fotométricas



3.2.2.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes químicos de grau analítico (Merck) e água deionizada (resistividade > 18 MΩ cm), em balões volumétricos de 25 mL.

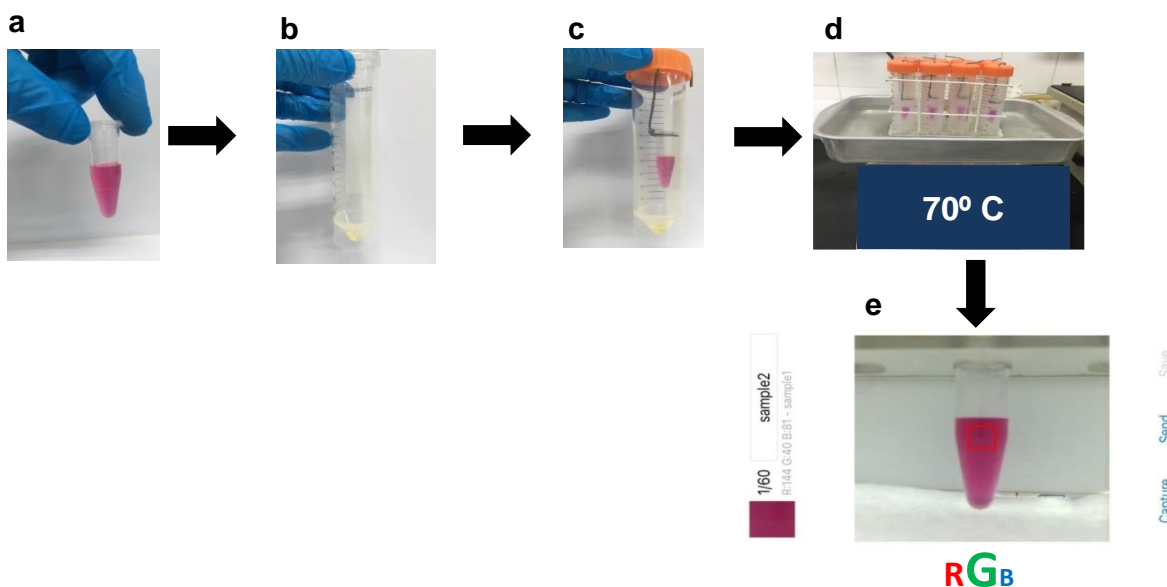
Solução de KMnO_4 $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada por diluição de uma solução estoque de $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$, padronizada com oxalato de sódio em meio ácido. Solução de H_2SO_4 $3,6 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diluindo 20 mL do ácido concentrado em 100 mL de água. Soluções padrão de metanol de $90\text{--}2000 \text{ mg kg}^{-1}$ foram preparadas por diluição de uma solução estoque de 10 g L^{-1} em água.

3.2.2.3. Procedimento

Imagens ilustrativas das diferentes etapas do procedimento são mostradas na Figura 8. O procedimento foi realizado adicionando 500 μL de H_2SO_4 3,6 mol L^{-1} e 250 μL da solução de KMnO_4 2,0 mmol L^{-1} em tubo Eppendorf[®] de 1,5 mL (Figura 8a) e 200 μL de biodiesel em tubo Falcon[®] de 50 mL (Figura 8b). O tubo Eppendorf[®] foi suspenso no interior do tubo Falcon (Figura 8c) e a microdestilação foi realizada em banho-maria a 70°C (Figura 8d). Após 40 min, as medidas fotométricas foram realizadas diretamente nos tubos (Figura 8e). Todas as medidas foram realizadas em triplicata e o sinal analítico (S) foi diretamente o valor do canal G, visto que as medidas foram baseadas na descoloração da solução de KMnO_4 . Até 8 amostras podem ser processadas simultaneamente.

As medidas dos sinais de referência foram realizadas em soluções de KMnO_4 , com a substituição da amostra por água.

Figura 8. Etapas do procedimento de microdestilação: a) H_2SO_4 + KMnO_4 , b) biodiesel, c) microdestilador com amostra e solução aceptora, d) microdestilação e e) medidas analíticas

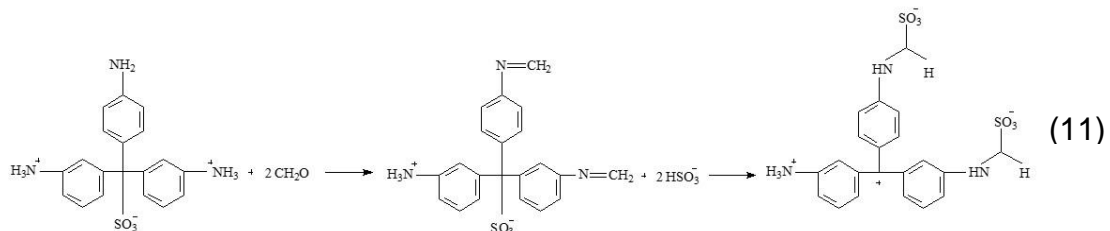
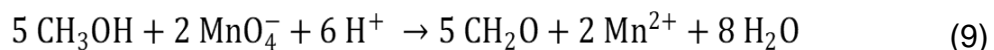


3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Procedimento analítico explorando extração líquido-líquido e derivação química para quantificar metanol em biodiesel

3.3.1.1. Aspectos gerais

A quantificação do metanol em biodiesel foi baseada em: (i) extração líquido-líquido do analito usando água como extrator, devido à favorável partição de um álcool de cadeia curta neste solvente e a baixa extração dos ésteres alquílicos, os quais são os principais constituintes do biodiesel; (ii) oxidação do metanol a formaldeído pelo KMnO_4 (Eq. 9); (iii) consumo do excesso de KMnO_4 por reação com o ácido oxálico (Eq. 10) e (iv) derivação química do formaldeído com o reagente de *Schiff* (Eq. 11), gerando o produto de cor púrpura.

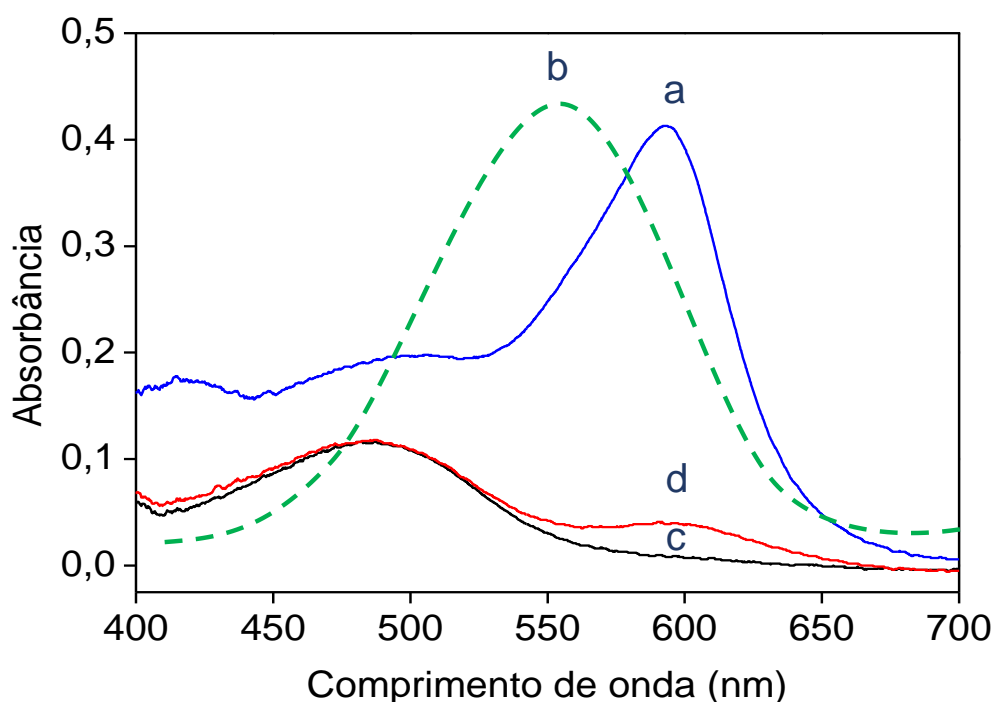


O reagente de *Schiff* é produzido pela reação entre a p-rosanilina e o sulfito em meio ácido (107,108). Esse reagente gera um produto de cor púrpura (máxima absorção em 590 nm) com aldeídos. O espectro de absorção na Figura 9a coincide com o encontrado na literatura (107,108) para o produto formado a partir do formaldeído e o reagente de *Schiff*. Verifica-se a sobreposição com a região espectral coberta pelo canal G do sistema RGB (Figura 9b) e, de fato, a resposta analítica neste canal corresponde a ca. 50% da variação total do sinal no sistema RGB. Além disso, os valores de G variaram linearmente com as concentrações de metanol, demonstrando que esse componente espectral fornece as informações

analíticas necessárias. O espectro na Figura 9c refere-se à absorção de radiação pelo reagente p-rosanilina (branco analítico).

O KMnO_4 é um oxidante forte e também pode oxidar o glicerol a formaldeído, de forma semelhante ao observado na reação com periodato (6) ($E^\circ (\text{IO}_4^-/\text{IO}_3^-) = 1,6 \text{ V}$; $E^\circ (\text{MnO}_4^-/\text{Mn}^{2+}) = 1,5 \text{ V}$). Devido à partição favorável do glicerol para a fase aquosa, na extração líquido-líquido do metanol, é relevante avaliar a possibilidade de interferência do glicerol no procedimento proposto. Para isso, o procedimento proposto também foi realizado com glicerol 200 mg kg^{-1} , limite máximo permitido em biodiesel. O espectro na Figura 9d indica a formação de formaldeído a partir do glicerol e, na concentração avaliada, a resposta corresponde à 3% daquela obtida para metanol 2000 mg kg^{-1} . Dessa forma, a interferência é desprezível no procedimento proposto, considerando que as concentrações no biodiesel devem ser menores que 200 mg kg^{-1} . Entretanto, deve-se esperar que o glicerol consuma parte do KMnO_4 e um excesso de oxidante precisa ser assegurado.

Figura 9. Espectros de absorção do produto da reação formado a partir de metanol 2000 mg kg^{-1} (a), glicerol 200 mg kg^{-1} (d) e branco (c). A linha tracejada (b) representa a região espectral coberta pelo canal G



A presença do etanol junto com o metanol não é esperada, visto que não é usual empregar uma mistura dos álcoois na reação de transesterificação; entretanto, o seu efeito no procedimento proposto também foi avaliado. Como esperado, nas condições reacionais, o acetaldeído produzido pela oxidação de 2000 mg kg⁻¹ de etanol não reagiu com o reagente de *Schiff* (107) e a resposta analítica não diferiu daquela obtida para o branco.

Com relação às medidas fotométricas com a câmera do *smartphone*, os efeitos de microtubos incolores de diferentes fornecedores e da área de medida nas medidas fotométricas foram avaliados. Variações das respostas analíticas entre os diferentes microtubos não foram significativas (CV < 1%, n = 10). Além disso, os resultados não foram afetados pela variação da área de medida (32 × 32 e 64 × 64), utilizando a mesma região do tubo: coeficientes de correlação semelhantes (0,996 e 0,994) e inclinações (variações inferiores a 0,9%). No entanto, a inclinação foi 30% menor quando as medidas foram realizadas na parte inferior do tubo, devido à limitação da área para a medida analítica. A linearidade diminuiu para medidas realizadas sem iluminação controlada (r = 0,945), bem como quando aumentou a distância entre a câmera e o tubo (r = 0,971 usando 8 cm em vez de 5 cm). Uma correlação linear entre as respostas analíticas e a concentração de metanol (r = 0,996) também foi observada quando foi usado outro *smartphone* (Motorola, Moto G4 Plus, câmera de 16 megapixels, e abertura de lente de f/2.0), mas com uma inclinação 20% menor, que se deve a menor abertura de lente do *smartphone* Motorola. Dessa forma, conclui-se que para obter resultados confiáveis, as medidas analíticas devem ser realizadas na mesma região do tubo, com iluminação controlada e distância focal constante.

3.3.1.2. Otimização

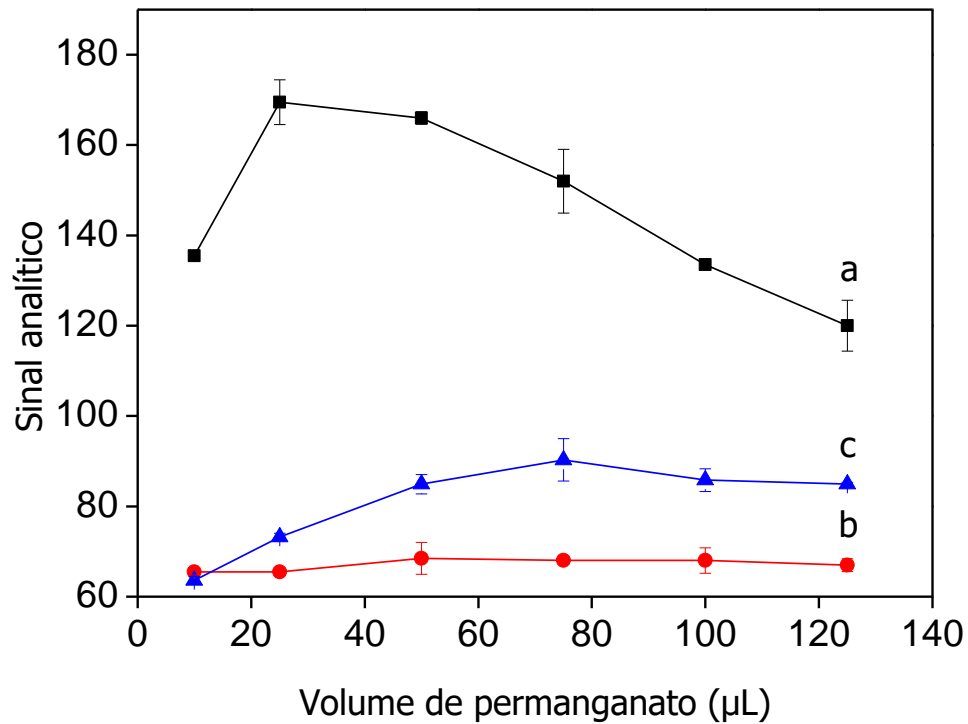
Diferentes reagentes foram avaliados para a oxidação de metanol a formaldeído, na mesma concentração (190 mmol L⁻¹), tais como: de KMnO₄ em meio de H₂SO₄ 2,4 mol L⁻¹, peróxido de hidrogênio preparado em NaOH ou H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ e metaperiodato de sódio em tampão acetato (pH 5,5), descrito no item 5.2.2. No entanto, em testes qualitativos utilizando o reagente de *Schiff*, a formação de formaldeído foi observada somente com o KMnO₄. O peróxido de hidrogênio e o metaperiodato de sódio podem produzir espécies com estados oxidativos mais altos (ou seja, ácido fórmico ou dióxido de carbono) a partir do metanol (109).

O KMnO_4 é um oxidante amplamente disponível e relativamente barato, o que é interessante para um procedimento dedicado à análise de rotina.

Os volumes das soluções de KMnO_4 , ácido oxálico e reagente de *Schiff* e o tempo de reação foram otimizados pelo método univariado, visando à maior resposta analítica e o mínimo consumo de reagentes. As concentrações das soluções (KMnO_4 190 mmol L^{-1} em H_2SO_4 2,4 mol L^{-1} , ácido oxálico 400 mmol L^{-1} e p-rosanilina 10 mmol L^{-1}) e o volume da solução padrão de metanol 500 mg kg^{-1} (600 μL) foram fixados.

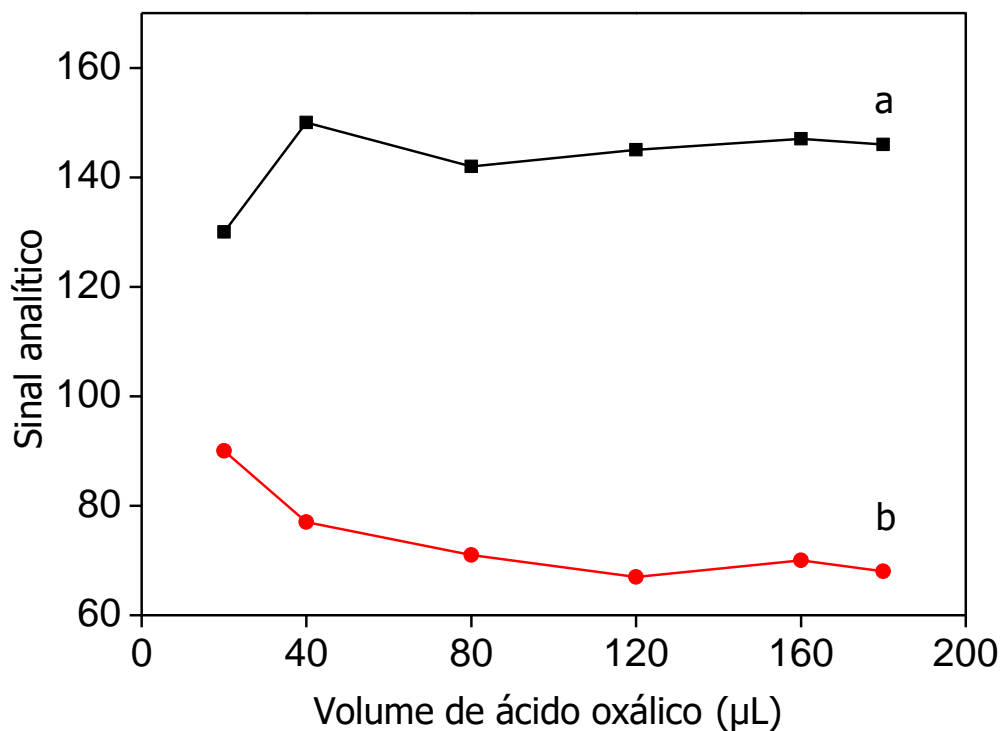
O efeito do volume de KMnO_4 foi avaliado utilizando soluções aquosas de metanol 500 mg kg^{-1} (Figura 10a) e glicerol 200 mg kg^{-1} (Figura 10c). Essa avaliação é necessária para garantir uma condição que favoreça a oxidação do metanol a formaldeído, com mínimo efeito sobre a oxidação do glicerol, conforme discutido anteriormente. Com volumes menores que 25 μL de solução de KMnO_4 não foi possível oxidar quantitativamente o metanol, enquanto com volumes maiores ocasionaram diminuição da resposta analítica, provavelmente devido à formação de ácido fórmico e dióxido de carbono ao invés de formaldeído. Então, escolheu-se 25 μL como o volume ótimo, pois garante um excesso de 30% do reagente em relação a 500 mg kg^{-1} metanol e o efeito sobre a oxidação do glicerol é pouco significativo (apenas 8% da resposta observada para metanol).

Figura 10. Efeito do volume de solução de KMnO_4 na resposta analítica para metanol 500 mg kg^{-1} (a), sinal do branco (b) e glicerol 200 mg kg^{-1} (c). Condições experimentais: $600 \mu\text{L}$ de amostra, KMnO_4 190 mmol L^{-1} , ácido oxálico 400 mmol L^{-1} , p-rosanilina 10 mmol L^{-1} e tempos de reação = 5 min (oxidação do metanol) e 30 min para formação do produto de medida. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



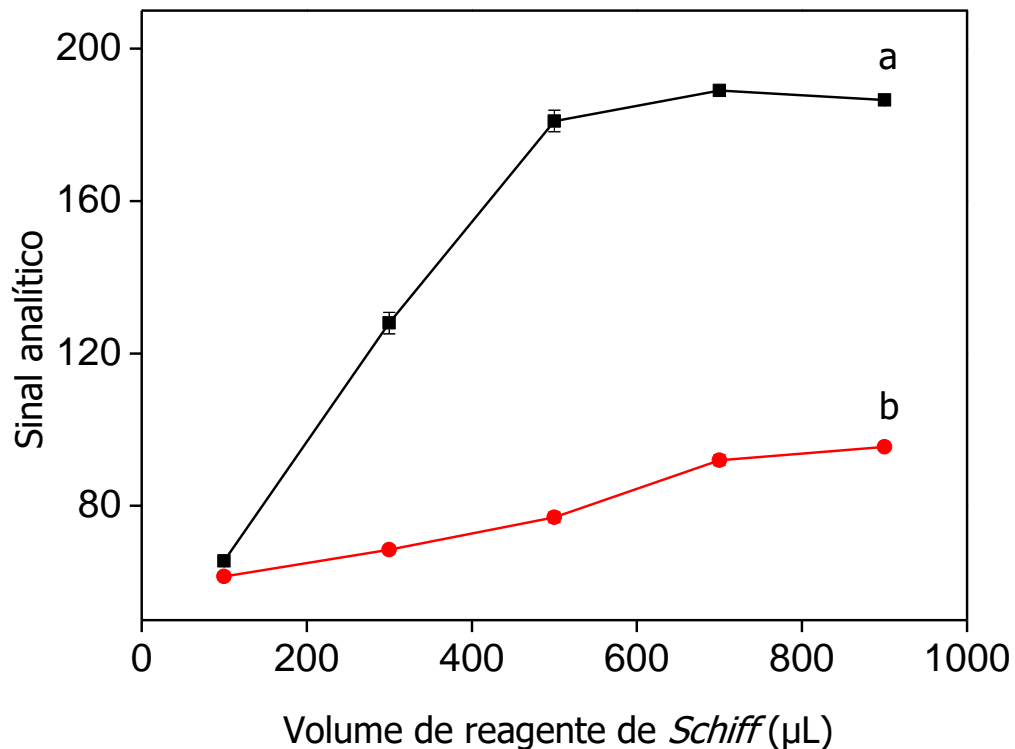
A cor complementar da solução de KMnO_4 é a mesma que a do produto gerado com o formaldeído, o que também geraria resposta no canal G. Além disso, o excesso de oxidante pode afetar a formação do produto de medida pela reação de *Schiff*, consumindo íons sulfito. Esses efeitos foram observados para volumes de solução de ácido oxálico inferiores a $40 \mu\text{L}$ (Figura 11a). Diante disso, o excesso de KMnO_4 deve ser eliminado, após a oxidação do metanol para não afetar a resposta analítica. Como pode se observar pelos valores de branco (Figura 11b), volumes inferiores a $120 \mu\text{L}$ não foram suficientes para consumir todo KMnO_4 remanescente. Então, escolheu $120 \mu\text{L}$ como o volume ótimo, já que o excesso do reagente (4 vezes em relação à concentração inicial de KMnO_4) não afetou a reação de *Schiff*.

Figura 11. Efeito do volume de solução de ácido oxálico na resposta analítica para metanol 500 mg kg^{-1} (a) e branco (b). Condições experimentais: $600 \mu\text{L}$ de amostra, KMnO_4 190 mmol L^{-1} ($25 \mu\text{L}$), ácido oxálico 400 mmol L^{-1} , p-rosanilina 10 mmol L^{-1} e tempos de reação = 5 min (oxidação do metanol) e 30 min para formação do produto de medida. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



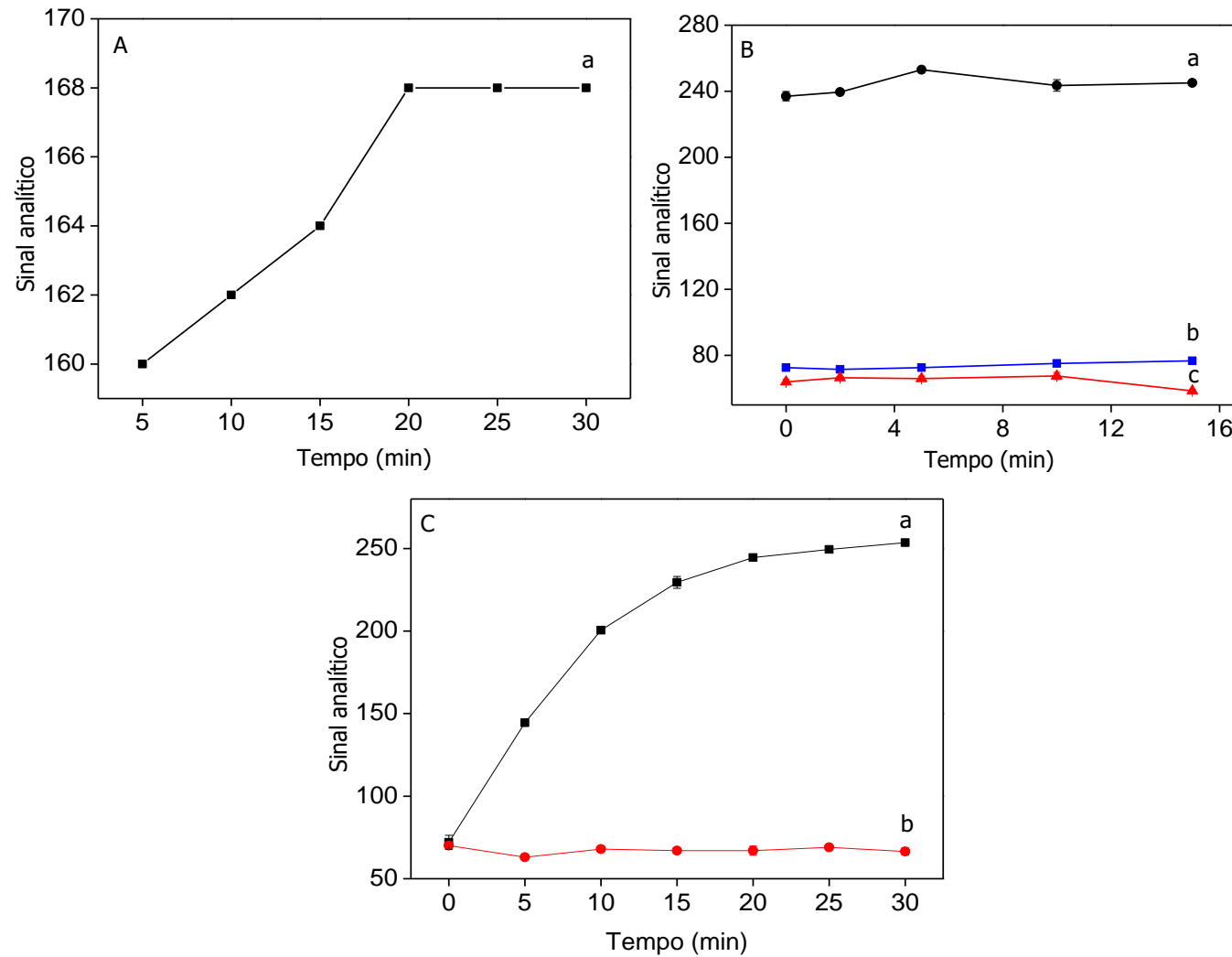
A quantidade do reagente de *Schiff* afetou tanto a resposta analítica quanto o sinal do branco, devido à cor do reagente. Como mostra a Figura 12a, a resposta analítica aumentou linearmente até o volume de $500 \mu\text{L}$. O volume de $500 \mu\text{L}$ foi definido como ótimo, devido à maior diferença da resposta analítica em relação ao branco analítico (Figura 12b) e porque a concentração de p-rosanilina corresponde estequiometricamente à maior quantidade de metanol (2000 mg kg^{-1}) permitida no biodiesel.

Figura 12. Efeito do volume de reagente de *Schiff* na resposta analítica para metanol 500 mg kg^{-1} (a) e branco (b). Condições experimentais: $600 \mu\text{L}$ de amostra, KMnO_4 190 mmol L^{-1} ($25 \mu\text{L}$), ácido oxálico 400 mmol L^{-1} ($120 \mu\text{L}$), p-rosanilina 10 mmol L^{-1} e tempos de reação = 5 min (oxidação do metanol) e 30 min para formação do produto de medida. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



Os efeitos do tempo sobre a extração do metanol do biodiesel, oxidação a formaldeído e formação do produto de medida foram avaliados. A extração de metanol do biodiesel é favorecida por sua alta solubilidade em água e, conforme observado na (Figura 13A), a extração do analito foi relativamente rápida (ca. 92% do analito foi extraído em 5 min). Os resultados indicam que a extração completa foi observada após 20 min, que foi selecionado como tempo ótimo para a extração. Foi observado (Figura 13B) que a oxidação do metanol a formaldeído também é relativamente rápida, definindo 5 min como condição ótima. As respostas obtidas para o glicerol (Figura 13B, c) não foram significativamente diferentes do branco (Figura 13B, b). A formação do produto de medida atingiu a condição de estado estacionário com 20 min (Figura 13C), que foi definido como o tempo ótimo para realizar as medidas analíticas.

Figura 13. Efeito do tempo no processo de extração do metanol (A), oxidação do metanol pelo KMnO_4 (B) e formação do produto de medida (C): (a) metanol 500 mg kg^{-1} , (b) branco e (c) glicerol 200 mg kg^{-1} . Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



3.3.1.3. Características analíticas

Utilizando as condições otimizadas, respostas lineares foram obtidas de 20–500 mg kg⁻¹ (600 µL) e 500–2000 mg kg⁻¹ de metanol (150 µL), descritas pelas equações $S = 69 + 0,246C$, $r = 0,995$ e $S = 67 + 0,088C$, $r = 0,997$, respectivamente. O CV ($n = 10$) e o LD (nível de confiança de 99,7%) foram de 4,8% e 10 mg kg⁻¹ (600 µL de extrato da amostra) e 150 mg kg⁻¹ (150 µL de extrato da amostra), respectivamente. O LD foi estimado como a menor concentração de analito que produziu uma resposta analítica significativamente diferente do sinal de referência (ou seja, o valor G obtido na ausência dos analitos) com 95% de confiança.

Recuperações do analito adicionado às amostras foram estimadas para avaliar a eficiência da extração líquido-líquido e a ocorrência de efeitos de matriz (Tabela 2). Em todas as amostras, a concentração de metanol anteriormente à adição foi inferior ao LD. Com exceção da amostra preparada a partir de 90% soja/10% sebo, cuja recuperação foi de $80 \pm 8\%$, as recuperações variaram de $92 \pm 4\%$ a $102 \pm 1\%$, o que indica a eficiência da extração líquido-líquido e a ausência de efeitos de matriz no procedimento proposto. Dessa forma, a calibração pode ser realizada com soluções aquosas de metanol. Para avaliar a exatidão, diferentes amostras foram analisadas pelo procedimento proposto e de referência, baseado em GC-FID (11) (Tabela 3). Os resultados foram comparados utilizando o teste *t* pareado e o valor obtido (0,391) foi inferior ao valor crítico (2,571), indicando que os resultados concordaram no nível de confiança de 95%.

Tabela 2. Recuperações de metanol (250 e 800 mg kg⁻¹) adicionado a amostras de biodiesel produzido de diferentes matérias-primas

Biodiesel (matéria-prima)	Metanol (mg kg ⁻¹)*	
	Encontrado	Recuperado (%)
100% soja	260 ± 2	102 ± 1
90% soja/ 10% algodão	820 ± 2	102 ± 1
90% soja/ 10% sebo	200 ± 20	80 ± 8
90% soja/ 30% sebo	230 ± 10	92 ± 4
93% soja/ 5% sebo/ 2% algodão	250 ± 20	100 ± 8

*Média ± desvio padrão ($n = 3$)

Tabela 3. Quantificação de metanol em biodiesel pelos procedimentos proposto e de referência

Biodiesel (matéria-prima)	Metanol (mg kg ⁻¹)*	
	Proposto	Referência (11)
100% soja	24 ± 3	28 ± 3
90% soja/ 10% algodão	75 ± 8	75 ± 8
90% soja/ 10% sebo	390 ± 4	349 ± 35
90% soja/ 30% sebo	520 ± 2	582 ± 29
93% soja/ 5% sebo/ 2% algodão	28 ± 4	35 ± 4

*Média ± desvio padrão (n = 3)

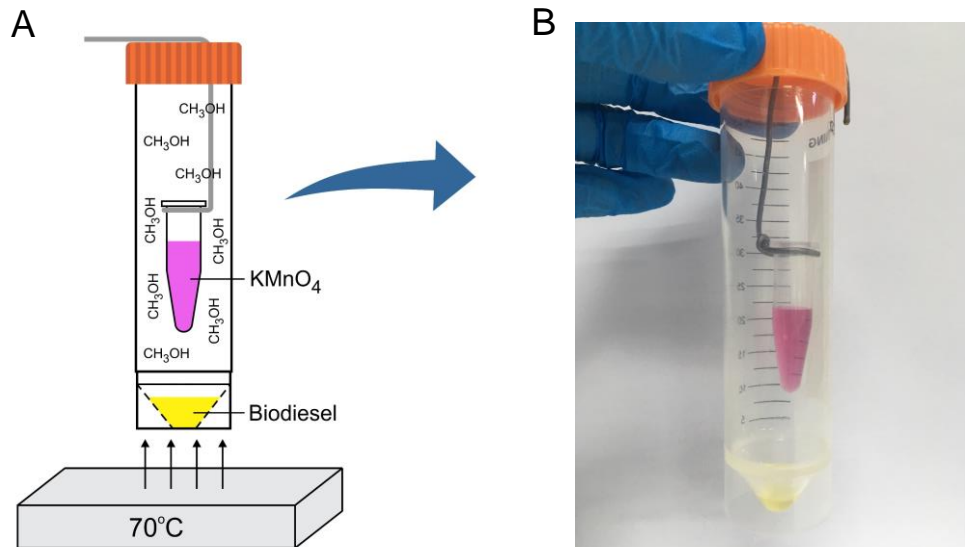
O procedimento proposto consome apenas 750 µg de KMnO₄, 6 mg de ácido oxálico, 1,5 mg de p-rosanilina e gera ca. 1,2 mL de resíduo por análise. Entretanto, necessita da extração líquido-líquido do metanol do biodiesel e derivação química, tornando o procedimento laborioso. Isto motivou o desenvolvimento de outro procedimento alternativo, que foi baseado na microdestilação do metanol do biodiesel e sua quantificação por DIP.

3.3.2. Procedimento analítico explorando microdestilação para a quantificação de metanol em biodiesel

3.3.2.1. Aspectos gerais

Durante o desenvolvimento do procedimento para a quantificação de metanol, descrito no item 3.3.1, vislumbrou-se a possibilidade de desenvolver um procedimento alternativo, utilizando um sistema simples e de baixo custo para microdestilação, visando evitar as etapas de extração líquido-líquido e derivação química com o reagente de *Schiff* e a interferência do glicerol, que também é oxidado a formaldeído. Essa estratégia é viável porque o metanol (ponto de ebulição de 65 °C (110)) é mais volátil do que o glicerol (ponto de ebulição de 290 °C(111)). O sistema de microdestilação foi construído no laboratório e consistiu de um tubo Eppendorf® de 1,5 mL, contendo a solução absorvedora, suspenso em um tubo Falcon® de 50 mL, contendo a amostra de biodiesel, conforme ilustrado na Figura 14.

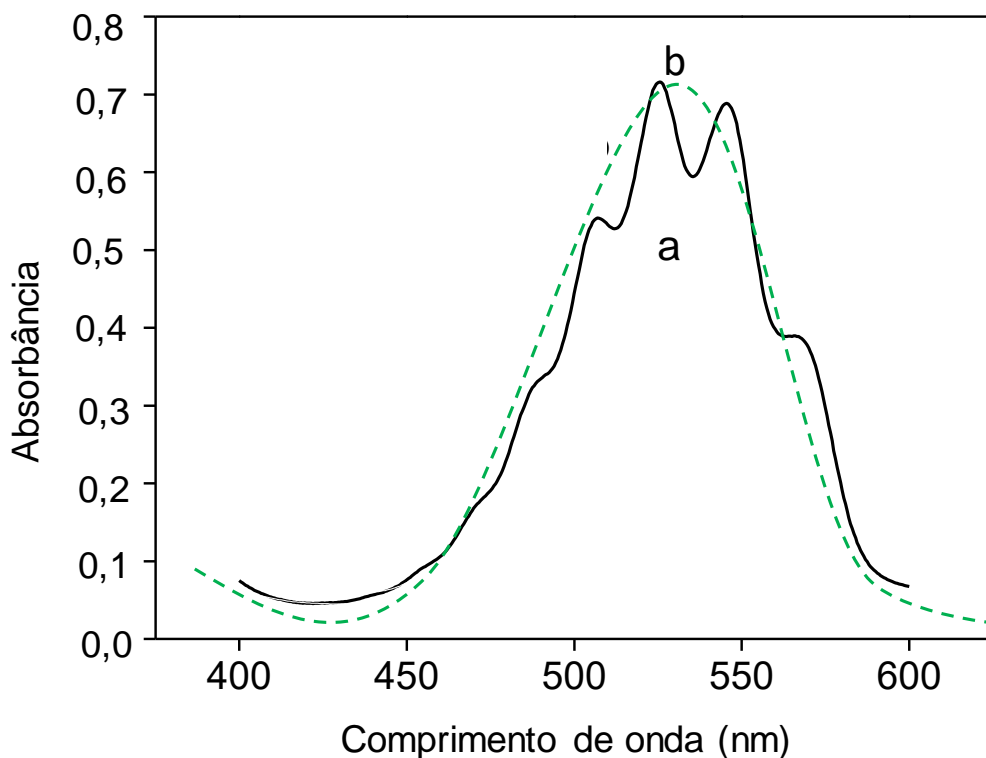
Figura 14. Representação esquemática (A) e fotografia (B) do sistema de microdestilação



O procedimento proposto foi baseado na: (i) microdestilação do metanol do biodiesel, favorecida pela alta volatilidade (ponto de ebulição 65°C (110)); (ii) absorção do metanol em uma solução ácida de KMnO_4 ; (iii) redução do permanganato a Mn(II) , devido à oxidação de metanol a formaldeído (Eq. 9, item 3.3.1.1) e (iv) medida fotométrica por imagens digitais, baseada na descoloração do KMnO_4 .

O espectro de absorção da solução de KMnO_4 (Figura 15a) se sobrepõe à região espectral referente ao canal G do sistema RGB (Figura 15b), que se refere à cor complementar da solução. A resposta analítica no canal G corresponde a ca. 80% da variação total de resposta nos canais RGB. Além disso, a descoloração da solução de KMnO_4 (valores de G) foi proporcional à concentração de metanol.

Figura 15. Espectro de absorção de solução de KMnO_4 2 mmol L^{-1} (a) e região espectral coberta pelo canal G (b)



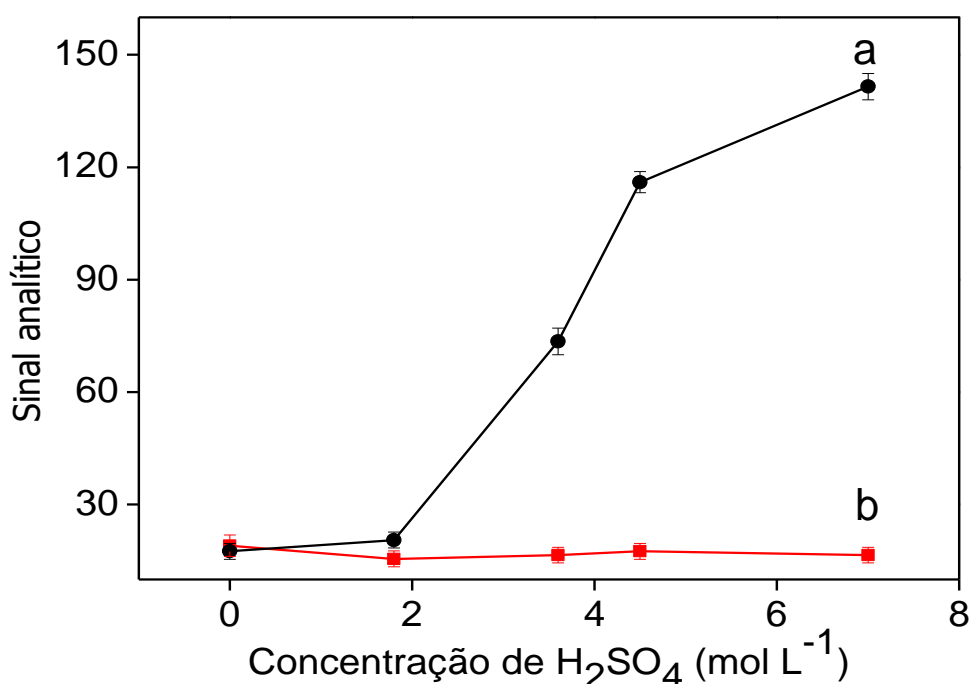
3.3.2.2. Otimização

A concentração de H_2SO_4 , os volumes de KMnO_4 e de amostra, a temperatura e o tempo para microdestilação do metanol foram otimizados pelo método univariado, visando maximizar a resposta analítica e minimizar a quantidade de resíduo gerado. O volume de H_2SO_4 foi fixado em $500 \mu\text{L}$ e as concentrações da solução padrão de metanol e de KMnO_4 em 2000 mg kg^{-1} e $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente.

O metanol pode ser oxidado pelo KMnO_4 a formaldeído, a ácido fórmico ou a dióxido de carbono, dependendo da acidez do meio (109). Essas reações apresentam estequiometrias diferentes, consumindo diferentes quantidades de KMnO_4 . Para a aplicação proposta, é fundamental assegurar uma estequiometria de reação constante, ou seja, que a descoloração da solução de KMnO_4 seja constante para uma dada concentração de metanol. Como observado na Figura 16, a maior resposta analítica foi alcançada com $7,0 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 , provavelmente pela formação de ácido fórmico ou dióxido de carbono. Isso foi verificado adicionando o reagente de

Schiff, após microdestilação, com teste negativo para formaldeído. Para avaliar a linearidade, foram obtidas curvas de calibração usando H_2SO_4 com concentrações de 3,6 e 7,0 mol L^{-1} , resultando em correlações lineares (r) de 0,982 e 0,932, respectivamente. A baixa correlação linear obtida com 7,0 mol L^{-1} indica que é mais difícil de controlar a reação para formação de ácido fórmico ou dióxido de carbono. Considerando esses resultados, para os próximos estudos foi utilizada a solução de H_2SO_4 3,6 mol L^{-1} .

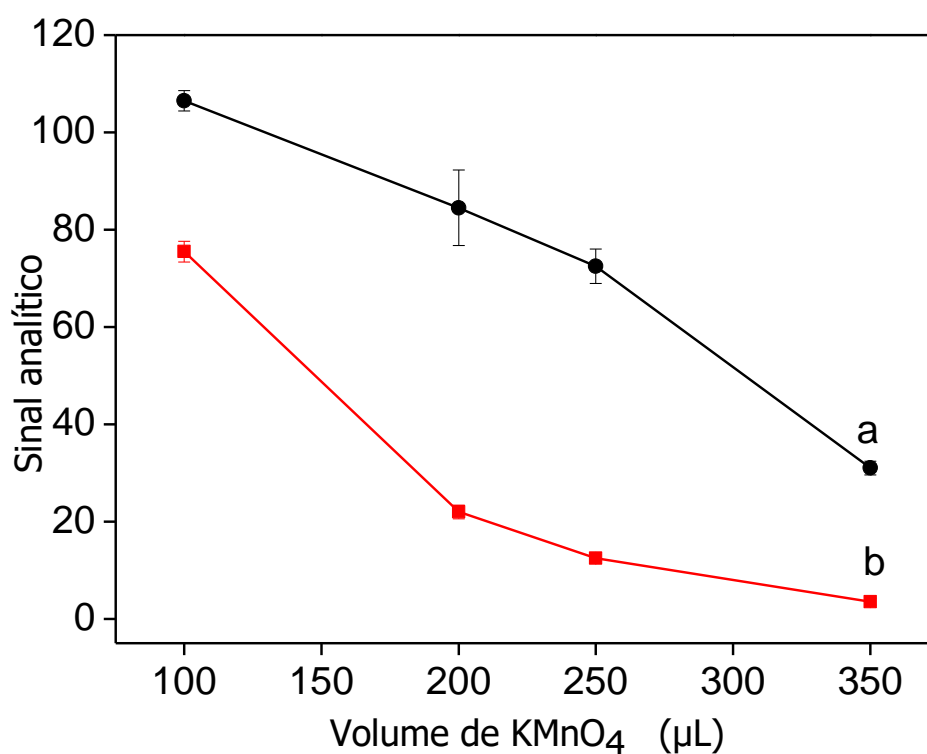
Figura 16. Efeito da concentração do H_2SO_4 na resposta analítica para (a) metanol 2000 mg kg^{-1} e (b) referência. Condições experimentais: 150 μL de amostra, 200 μL de KMnO_4 2,0 mmol L^{-1} e 500 μL de solução de H_2SO_4 . Tempo de microdestilação = 20 min. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



O volume de solução de KMnO_4 também é um parâmetro importante de ser avaliado, pois é necessário reagente suficiente para a oxidação de até 2000 mg kg^{-1} metanol (limite máximo permitido no biodiesel) a formaldeído e garantir uma quantidade remanescente de reagente adequada para a medida fotométrica. Entretanto, um grande excesso de reagente resultaria na saturação da resposta no canal de medida. A maior diferença entre os sinais analítico e de referência foi alcançada com 200 e 250 μL de uma solução de KMnO_4 2,0 mmol L^{-1} (Figura 17).

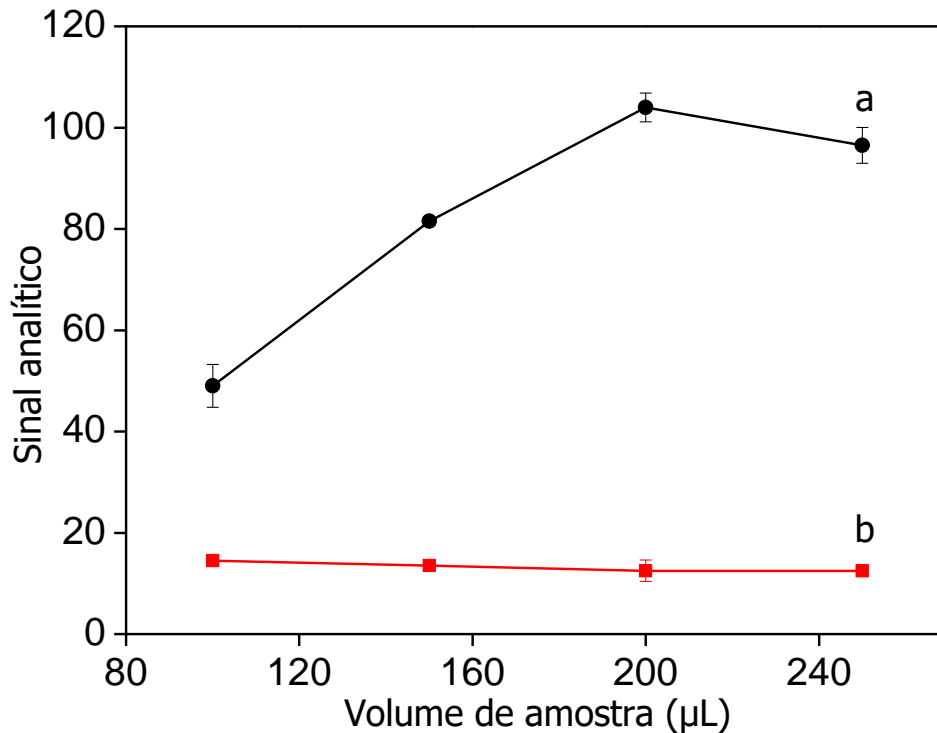
Com o volume de 100 μL ocorreu a aproximação dos sinais analítico e de referência, indicando a necessidade de um volume maior de reagente para oxidar todo o metanol a formaldeído. Já com 350 μL da solução reagente o sinal analítico obtido está próximo à condição de saturação. Então, foi definido 250 μL como o volume ótimo para os próximos estudos, pois obteve-se a maior resposta analítica e a melhor precisão.

Figura 17. Efeito do volume de solução de KMnO_4 na resposta analítica para (a) metanol 2000 mg kg^{-1} e (b) referência. Condições experimentais: 150 μL de amostra, KMnO_4 2,0 mmol L^{-1} , 500 μL de H_2SO_4 3,6 mol L^{-1} . Tempo de microdestilação = 20 min. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$).



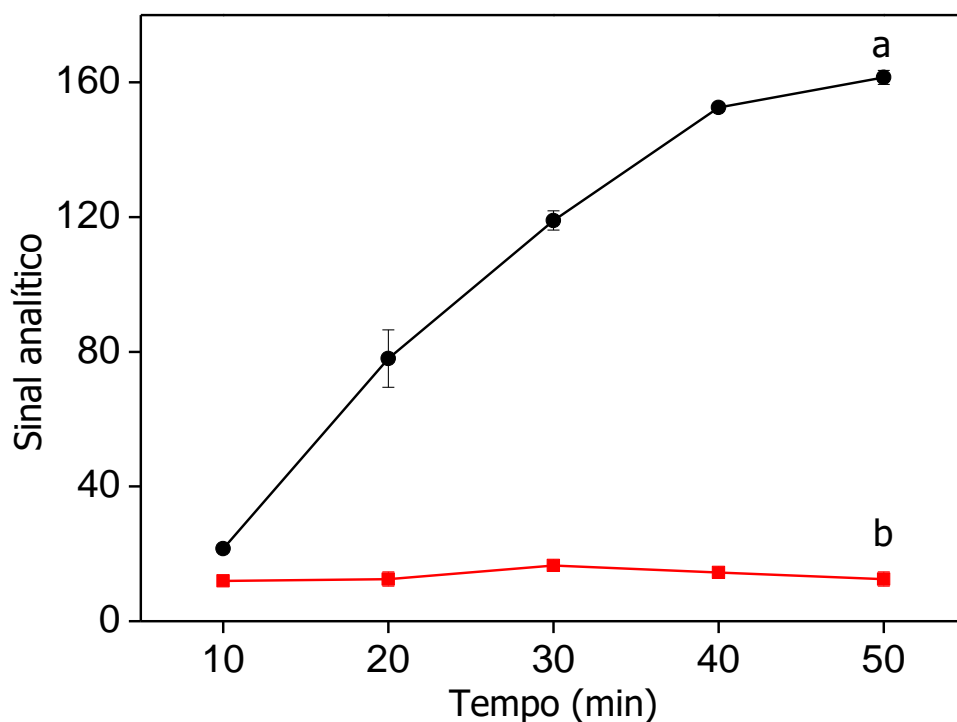
Quando o efeito do volume de amostra foi avaliado, foi observado que o sinal analítico aumentou linearmente até 200 μL (Figura 18). O efeito não significativo de volumes maiores de amostra no sinal analítico indica quantidade de reagente insuficiente para oxidar todo o metanol a formaldeído. Entretanto, como a resposta era adequada para a aplicação proposta, o volume de 200 μL de amostra foi selecionado para os próximos estudos.

Figura 18. Efeito do volume de amostra na resposta analítica para (a) metanol 2000 mg kg^{-1} e (b) referência. Condições experimentais: $250 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de KMnO_4 $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $500 \text{ }\mu\text{L}$ de H_2SO_4 $3,6 \text{ mol L}^{-1}$. Tempo de microdestilação = 20 min. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



A temperatura do banho utilizado para a microdestilação do metanol do biodiesel foi avaliada e, como esperado, o sinal analítico aumentou com temperaturas maiores. No entanto, melhor linearidade e reprodutibilidade foram alcançadas a $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Então o efeito do tempo sobre os processos envolvidos (microdestilação do metanol, absorção pela solução e oxidação a formaldeído pelo KMnO_4) foi avaliado nessa temperatura (Figura 19). O sinal analítico aumentou até 40 min e não se obteve diferenças significativas com tempos maiores, indicando que esse tempo foi suficiente para a microdestilação quantitativa do metanol do biodiesel. A temperatura do banho de $70 \text{ }^\circ\text{C}$ e o tempo de microdestilação de 40 min foram então selecionados como ótimos. Nessas condições, o sinal analítico obtido após a microdestilação de uma solução de metanol 1000 mg kg^{-1} foi comparado com aquele gerado pela adição da solução de metanol diretamente na solução aceptora, e a eficiência de transferência do metanol para a solução aceptora foi estimada em $98 \pm 3\%$.

Figura 19. Efeito do tempo na resposta analítica para (a) metanol 2000 mg kg⁻¹ e (b) referência. Condições experimentais: 200 µL de amostra, 250 µL de solução de KMnO₄ 2,0 mmol L⁻¹, 500 µL de H₂SO₄ 3,6 mol L⁻¹. Valores referem-se à média ± desvio padrão (n = 3)



3.3.2.3. Características analíticas

Nas condições otimizadas, foi estimada uma faixa de resposta linear de 250–2000 mg kg⁻¹ de metanol, descrita pela equação $G = 24 + 403C$ ($r = 0,982$). O intercepto da curva de calibração corresponde ao valor de G medido (23 ± 3) para a solução de KMnO₄ em meio ácido antes do processo de microdestilação. O CV (n = 10) e o LD (nível de confiança de 99,7%) foram estimados em 3,7% e 90 mg kg⁻¹. O LD foi estimado como a menor concentração de analito que produziu uma resposta analítica significativamente diferente do sinal de referência (ou seja, o valor G obtido na ausência dos analitos) com 95% de confiança. Variação de 5,6% foi observada quando comparadas as inclinações de curvas analíticas construídas usando uma solução de KMnO₄ recém preparada e outra armazenada por 3 meses, indicando a reprodutibilidade do procedimento. O procedimento requer apenas 100 µg de KMnO₄ e gera ca. 950 µL de resíduo por análise.

Com o objetivo de avaliar se a curva de calibração pode ser construída utilizando soluções padrão aquosas de metanol, foram comparadas respostas

analíticas obtidas utilizando soluções de concentração de metanol 500 mg kg^{-1} preparadas em água e em uma amostra de biodiesel isenta de metanol. Os resultados ($n = 3$) não foram significativamente diferentes para biodiesel $117 \pm 7\%$ e solução aquosa $129 \pm 7\%$, respectivamente, e isso indica que a temperatura adotada para a microdestilação é suficiente para volatilizar efetivamente o analito de ambas as matrizes. Essa é uma informação importante, pois espera-se que, devido à maior solubilidade no meio, seja desfavorecida a volatilização do metanol a partir de soluções aquosas. Um experimento de adição e recuperação foi realizado para avaliar a volatilização do metanol do biodiesel e a incidência de efeitos de matriz. Com exceção de uma amostra proveniente de 93% de óleo de soja, 5% de sebo e 2% de óleo de algodão, cuja recuperação foi de $129 \pm 9\%$, as recuperações variaram de $93 \pm 11\%$ a $109 \pm 5\%$, o que indica a eficiência do procedimento de microdestilação, a ausência de efeito de matriz e a possibilidade da quantificação de metanol por calibração externa.

Para a avaliação da exatidão, as amostras de biodiesel foram analisadas pelo procedimento proposto e aquele desenvolvido anteriormente, já que foi validado (item 3.3.1.4) e gerou resultados concordantes com o procedimento oficial baseado em GC-FID. Os resultados (Tabela 4) foram concordantes a nível de 95% de confiança.

Tabela 4. Quantificação de metanol em biodiesel pelo procedimento proposto e de referência

Biodiesel (matéria-prima)	Metanol (mg kg^{-1})*	
	Proposto	Referência
100% soja	340 ± 40	350 ± 40^a
	550 ± 10	580 ± 30^b
93% soja / 5% sebo / 2% algodão	430 ± 40	320 ± 20^a
	550 ± 80	500 ± 30^b
90% soja / 10% algodão	370 ± 40	300 ± 20^a
	520 ± 70	470 ± 30^b
70% soja / 30% sebo	430 ± 90	580 ± 30^b
90% soja / 10% sebo	360 ± 50	350 ± 40^a

*Média \pm desvio padrão ($n = 3$). Amostras adicionadas de (a) 300 ou (b) 500 mg kg^{-1} metanol

3.4. Comparação de procedimentos para quantificação de metanol em biodiesel

Os procedimentos propostos para a quantificação de metanol em biodiesel, utilizando a estratégia de extração líquido-líquido/derivação química ou microdestilação do analito apresentaram vantagens em comparação aos procedimentos descritos na Tabela 5. Os procedimentos baseados em GC-FID (103) e espectrofotometria/reação enzimática e difusão por membrana (105) requerem solventes tóxicos, xileno e n-butanol, respectivamente. Outros aspectos críticos são: custo do equipamento (103) e custo e estabilidade das enzimas (105). O procedimento baseado em GC-FID com SPME para extração do metanol, utiliza compatibilização de matriz para a calibração (11).

O procedimento para quantificar metanol em biodiesel utilizando extração líquido-líquido e derivação química é mais robusto para análises de rotina, além de ser bastante simples. O procedimento requer somente de uma câmara de medida, fabricada no próprio laboratório, uma câmera de um *smartphone* e um aplicativo de acesso livre para captura e conversão das imagens digitais em valores de RGB. O procedimento tem o LD 10 vezes menor que o procedimento que utiliza microdestilação.

Já o procedimento baseado na microdestilação do metanol do biodiesel é seletivo, e utilizou um sistema simples e de baixo custo, construído no próprio laboratório com tubos Falcon[®] de 50 mL e Eppendorf[®] de 1,5 mL. Além de ser de baixo custo, devido os materiais utilizados para a construção do sistema de microdestilação e por necessitar somente de um reagente, consome ca. 750 vezes menos KMnO_4 que o procedimento que utiliza extração líquido-líquido, atendendo aos requisitos da química verde por consumir pequenas quantidades de reagente e gerar pequenas quantidades de resíduos. Em adição, o procedimento utilizou um banho maria que permite que até 8 amostras sejam destiladas simultaneamente.

Tabela 5. Principais características dos procedimentos para quantificar metanol em biodiesel

Procedimento	Solvente	Volume de amostra (μL)	Volume de resíduo (mL)	Tempo de análise (min)	LD (mg kg^{-1})	Referência
GC-FID	n-butanol	800	>1,0	50	–	(103)
GC-FID/SPME	–	1000	1,0	60	60	(11)
Espectrofotometria/Reação enzimática e difusão por membrana	xileno	100	2,4	5	2	(105)
Voltametria/Difusão por membrana	–	1000	1,25	12	200	(104)
Extração líquido-líquido/DIP	água	1500	1,2	45	10	–
Microdestilação/DIP^a	água	200	0,95	40	90	–

^aAté 8 amostras podem ser processadas simultaneamente.

3.5. Conclusões

Os procedimentos propostos são inovadores com relação à utilização de DIP obtidas com a câmera de um *smartphone* para a quantificação de metanol em biodiesel. Ambos são alternativas viáveis aos procedimentos descritos na literatura, por requererem menores quantidades de reagentes e usarem somente água como solvente. Não foram observados efeitos de matriz nos procedimentos, o que possibilita o uso de calibração externa com soluções padrão de metanol preparadas em água. O procedimento utilizando a microdestilação é atraente por não necessitar da derivação química, nem extração líquido-líquido para separar o metanol do biodiesel. Além disso, os dois procedimentos possuem faixa linear adequada para determinar o limite máximo de metanol 2000 mg kg^{-1} permitido no biodiesel. Os resultados obtidos foram concordantes com os valores de metanol determinados pelos procedimentos de referência.

4. Procedimento analítico explorando fotometria por imagens digitais e um sistema de fase única para quantificar Ca e Mg em biodiesel³

Resumo

Um procedimento explorando fotometria por imagens digitais (DIP, do inglês *Digital-image photometry*) obtidas com a câmera de um *smartphone* foi desenvolvido para a quantificação de Ca e Mg em biodiesel sem extração prévia dos analitos. Um sistema em fase única entre amostra e reagentes foi obtido utilizando etanol como solvente mediador. O procedimento analítico baseia-se na descoloração de uma solução etanólica de Negro de Eriocromo T, em meio alcalino, ocasionada pela formação de complexos com íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . O valor do canal R foi utilizado como sinal analítico, considerando a complementaridade com a cor da solução de Negro de Eriocromo T. O CV ($n = 10$) e o LD foram estimados em 1,0 % e $3 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, com uma faixa de resposta linear de $10\text{--}75 \mu\text{mol L}^{-1}$, descrita pela equação $R = 0,612C + 93,1$ ($r = 0,999$). O procedimento foi seletivo para Ca e Mg, sem interferência de outros íons metálicos (Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+}) e componentes da amostra (glicerol, metanol e água) em concentrações superiores às esperadas no biodiesel. Os efeitos da matriz de biodiesel obtido a partir de diferentes matérias-primas foram desprezíveis (recuperações de 90 a 104%), viabilizando a calibração externa com soluções padrão preparadas em meio aquo-etanólico. O procedimento requer apenas $28 \mu\text{g}$ de Negro de Eriocromo T e $120 \mu\text{g}$ de NaOH e gera $935 \mu\text{L}$ de resíduo por análise. Os resultados para amostras de biodiesel produzidas a partir de diferentes matérias-primas concordaram com os obtidos pelo procedimento de referência, baseado em espectrometria de emissão óptica em plasma acoplado indutivamente (ICP OES, do inglês *Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*), após o preparo da amostra por quebra de emulsão, demonstrando que o procedimento proposto é uma alternativa viável para quantificação de Ca e Mg em biodiesel.

Palavras-chave: Controle de qualidade de biodiesel. Transesterificação. Catálise heterogênea.

³ SOARES, S.; FERNANDEZ, G. M.; MORAES, L. M. B; BATISTA, A. D.; ROCHA, F. R. P. Single-phase determination of calcium and magnesium in biodiesel using smartphone-based digital images. *Fuel*, v. 307, art. 121837, 2021.

Abstract

A single-phase procedure exploiting smartphone-based DIP was proposed for the quantifications of Ca and Mg in biodiesel, without analyte extraction, by exploiting ethanol as mediator solvent. The analytical procedure is based on discoloration of an alkaline Eriochrome Black T (EBT) ethanolic solution due to the formation of Ca^{2+} and Mg^{2+} complexes. Analytical signals were based on the responses at the R channels (RGB color system), considering the complementarity with the color of the EBT solution. CV ($n = 10$) and LD were estimated as 1.0 % and $3 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, with a linear response from 10 to $75 \mu\text{mol L}^{-1}$, described by equation $R = 0.612C + 93.1$ ($r = 0.999$). The procedure was selective for calcium and magnesium, without interference from other metal ions (Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , and Fe^{3+}) and sample components (glycerol, methanol and water) in concentrations higher than those expected to be found in biodiesel. Matrix effects for biodiesel obtained from different raw materials were negligible (recoveries from 90 to 104%), allowing to exploit external standard calibration with ethanolic reference solutions. The procedure requires only $28 \mu\text{g}$ EBT and $120 \mu\text{g}$ NaOH and generates $935 \mu\text{L}$ of waste per analysis. Results agreed with those obtained by ICP-OES after sample preparation by emulsion break, demonstrating the viability of the proposed procedure for the quantification of Ca and Mg in biodiesel.

Keywords: Biodiesel quality control. Transesterification. Heterogeneous catalysis.

4.1. Introdução

O biodiesel é usualmente produzido pela transesterificação de triglicerídeos com metanol na presença de um catalisador homogêneo, como os hidróxidos de sódio ou potássio (112). Entretanto, outras rotas catalíticas vêm sendo estudadas, como a catálise heterogênea com óxidos de Ca ou Mg impregnados em zeólitas (113–115). Esse processo oferece diversas vantagens em relação à catálise homogênea, como a possibilidade de reutilização do catalisador e, conseqüentemente, a redução da geração de resíduos e de custos. Esses catalisadores também têm possibilitado a utilização de matérias-primas de menor qualidade, com alto teor de ácidos graxos livres (113–115).

Devido ao uso desses catalisadores, resíduos de Ca e Mg podem ser encontrados no biodiesel e a norma brasileira estabelece que a soma das concentrações dessas espécies deve ser inferior a 5 mg kg^{-1} , pois valores maiores podem ocasionar corrosão e obstrução de partes do motor (2). O procedimento oficial para quantificar Ca e Mg em biodiesel é baseado em ICP OES e utiliza querosene, um solvente tóxico, para diluir a amostra (2). Procedimentos alternativos ao procedimento oficial foram desenvolvidos, mas a grande maioria requer equipamentos de alto custo e/ou estratégias laboriosas para o preparo da amostra (116–121) e solventes tóxicos, como xileno (120), isopropanol (122) e clorofórmio (123). Procedimentos de custos mais acessíveis também já foram desenvolvidos, explorando análises em fluxo e detecção espectrofotométrica (122) e colorimetria em papel (124), porém requerem a extração dos analitos (122) ou a formação de emulsão (124).

Neste contexto, visando simplificar a quantificação de Ca e Mg em biodiesel, propôs-se desenvolver um procedimento em fase única utilizando o etanol como solvente mediador e detecção por fotometria com imagens digitais obtidas com *smartphone*.

4.2. Parte experimental

4.2.1. Equipamentos e acessórios

Um Iphone (SE) equipado com uma câmera de 8 megapixels com abertura de lente de $f/2.2$ e o aplicativo PhotoMetrix®1.8. (106) foram utilizados para captura das imagens e conversão ao sistema RGB. A captura das imagens foi realizada sob

iluminação controlada, utilizando uma câmara construída no próprio laboratório, constituída por uma caixa de isopor com dimensões de 190 x 210 x 125 mm de altura, comprimento e largura, respectivamente, e uma lâmpada de 30 LEDs (intensidade luminosa de 50 lux) acoplada ao fundo (Figura 5, item 3.2.1.1). A câmara do *smartphone* foi posicionada a 5,0 cm do tubo Eppendorf® contendo as soluções para a medida analítica.

Os espectros de absorção UV-Vis foram adquiridos com espectrofotômetro multicanal (Ocean Optics®, EUA) com uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

4.2.2. Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas utilizando reagentes e solventes de grau analítico e água deionizada (resistividade > 18 MΩ cm), em balões volumétricos.

Solução de Negro de Eriocromo T (NET) 2,0 mmol L⁻¹ foi preparada pela dissolução de 0,046 g do reagente (Sigma-Aldrich) em 50 mL de etanol anidro. Uma solução estoque de NaOH 0,50 mol L⁻¹ (Merck) foi preparada pela dissolução do reagente (Merck) em água e padronizada por volumetria ácido-base. A solução de trabalho de NaOH 50 mmol L⁻¹ foi preparada por diluição da solução estoque em etanol anidro.

Soluções padrão de Ca e Mg 20 mmol L⁻¹ foram preparadas a partir de CaCO₃ e MgO (Alfa Aesar) com dissolução em HCl. Soluções padrão de 3–75 μmol L⁻¹ foram preparadas por diluição dessas soluções em etanol anidro.

Amostras de biodiesel produzidas a partir de diferentes matérias-primas (óleos de soja e de algodão e gordura animal) foram obtidas diretamente das usinas de produção.

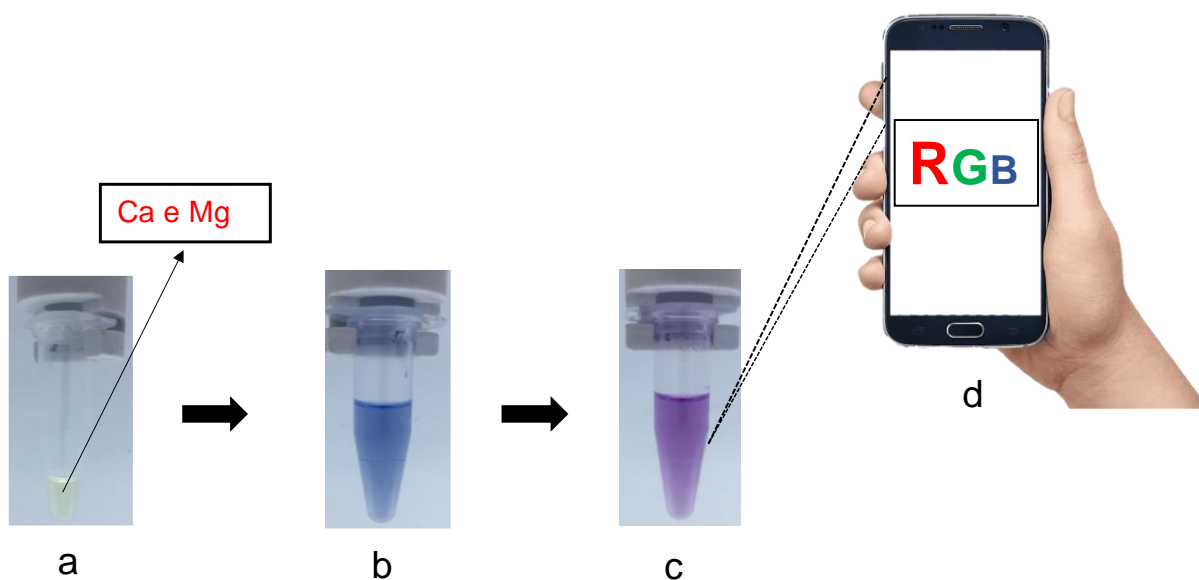
4.2.3. Procedimento

O procedimento analítico, representado na Figura 20, foi realizado em um tubo Eppendorf® de 1,5 mL, adicionando 150 μL da solução padrão ou amostra (diluída 1:5 v/v em etanol) (Figura 20a), 700 μL de etanol anidro e 25 μL de NET 2,0 mmol L⁻¹ (Figura 20b), seguido de agitação manual. Posteriormente, foi adicionado 30 μL da solução de NaOH 50 mmol L⁻¹ nos tubos contendo as soluções padrão e

60 μL naqueles contendo as amostras. Após 5 min de reação (Figura 20c), as medidas analíticas foram realizadas (Figura 20d).

As medidas fotométricas foram baseadas na intensidade da radiação refletida, com uma região de interesse de 32×32 pixels, nas condições descritas no item 4.2.1. Os valores do canal R do sistema RGB foram utilizados diretamente como o sinal analítico. Soluções preparadas com a substituição da amostra por etanol anidro foram usadas para medida dos sinais de referência.

Figura 20. Etapas do procedimento analítico para a quantificação de Ca e Mg. a) amostra, b) amostra + etanol + NET, c) amostra + etanol + NET + NaOH e d) medidas analíticas.



4.2.4. Procedimento de referência

O procedimento de referência foi baseado em ICP OES (Thermo Scientific, modelo iCAP7400 Duo, USA) com medidas realizadas na visão axial (117), nas condições recomendadas pelo fabricante, após extração de Ca e Mg de amostras de biodiesel utilizando quebra de emulsão (119). Esse procedimento foi realizado adicionando em tubos Falcon[®] de 15 mL, 1 mL de biodiesel, 2,0 mL de solução de Triton X-114 7,5 % (m/v) preparada em HNO_3 2,1 mol L^{-1} e 9 mL de água. As misturas foram agitadas por 60 min, centrifugadas por 5 min e aquecidas a 90 °C (10 min) em banho-maria até a quebra da emulsão (119). Em seguida, 9,8 mL das fases aquosas foram coletadas e, em cada extrato, foi adicionado 200 μL de uma solução de ítrio 100 mg L^{-1} como padrão interno. O sinal analítico foi calculado como a razão entre as

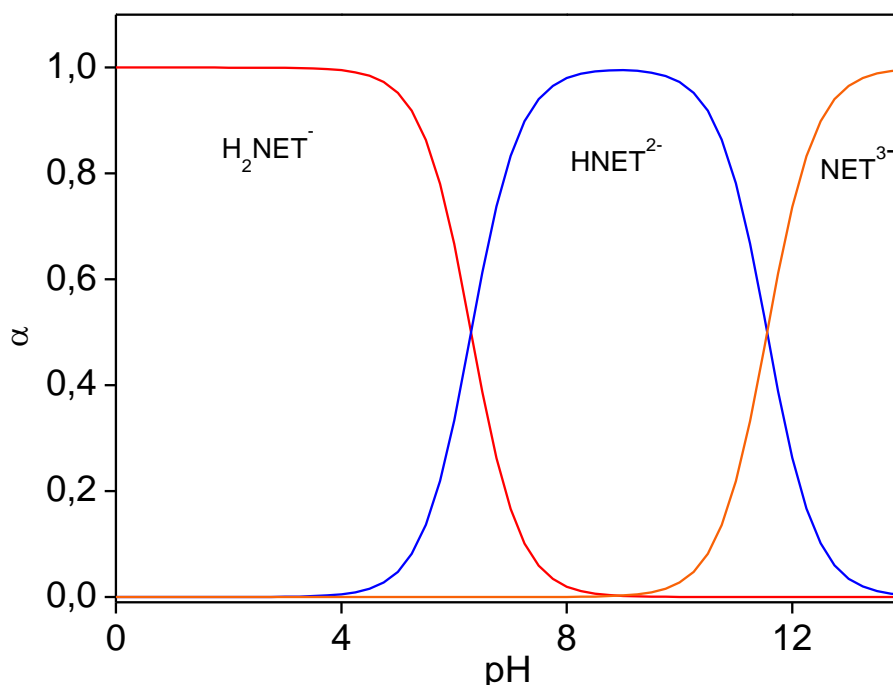
intensidades das linhas de emissão do Ca (317,933 nm) ou Mg (279,533 nm) e do ítrio (371,030 nm).

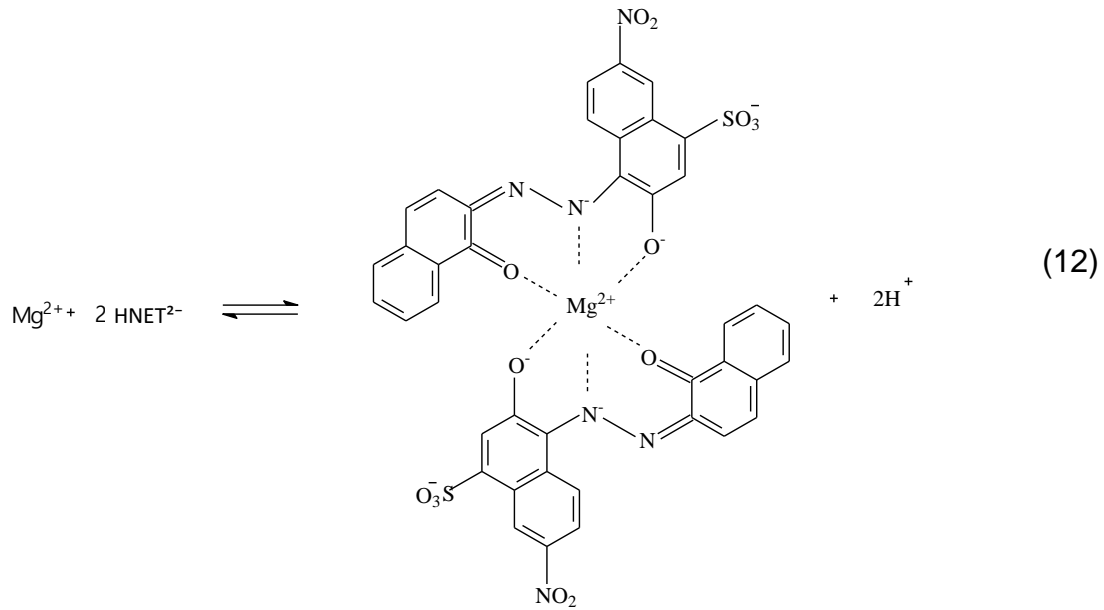
4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Aspectos gerais

A quantificação de Ca e Mg foi baseada na descoloração de uma solução de NET, devido à formação dos complexos correspondentes. Em pH entre 8–12 predomina a forma azul da espécie HEBT^{2-} , como mostra a Figura 21. A formação dos complexos com Ca^{2+} e Mg^{2+} é termodinamicamente favorável ($K_f [\text{Ca}(\text{NET})_2]^{4-} = 2,5 \times 10^5$ e $K_f [\text{Mg}(\text{NET})_2]^{4-} = 1,0 \times 10^7$) e, nessa faixa de pH, resulta na alteração da coloração da solução de azul para lilás (complexo vermelho + excesso do EBT azul). (122,125). A formação do complexo com Mg^{2+} é representada pela Eq. 12.

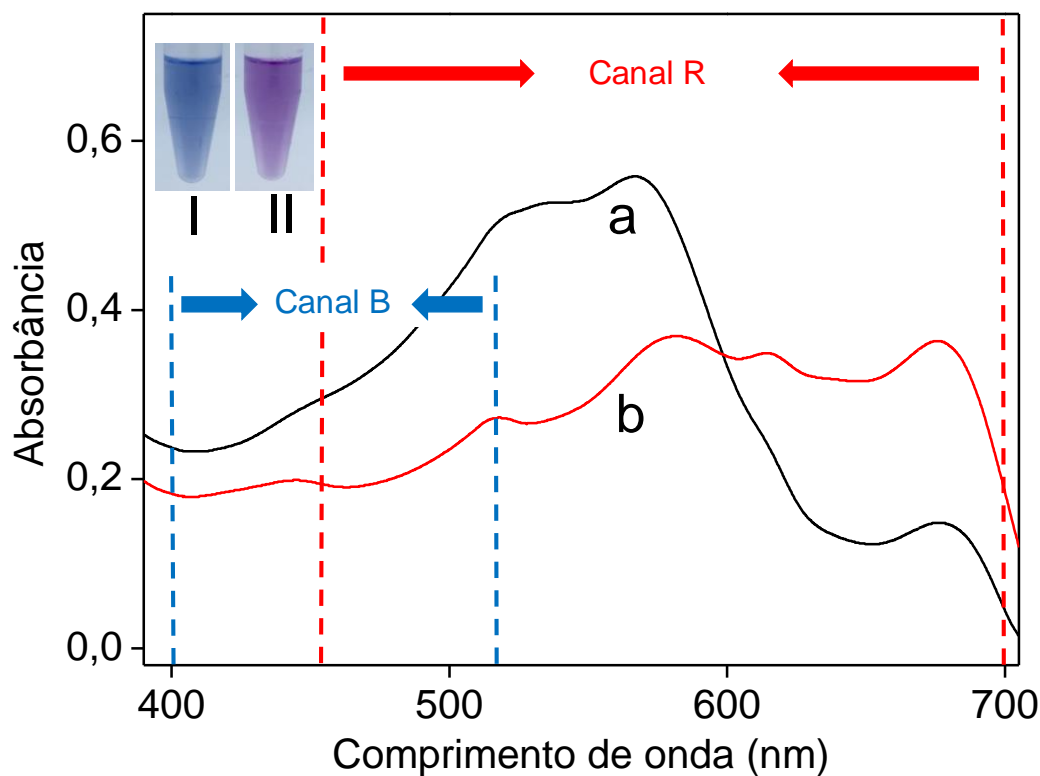
Figura 21. Diagrama de distribuição das espécies de NET em função do pH. Coloração da solução: H_2NET^- (vermelho), HNET^{2-} (azul) e NET^{3-} (laranja)





A quantificação de Ca e Mg pode ser baseada no monitoramento da formação do complexo vermelho ou diminuição da concentração de NET. Os espectros de absorção da solução de NET (Figura 22a) e dos complexos formados com o Ca e Mg (Figura 22b), correspondem às regiões espectrais relacionadas aos canais R e B do sistema RGB, referentes às cores complementares da solução de NET e dos complexos formados, respectivamente. A resposta analítica no canal R (descoloração da solução de NET) corresponde a ca. 80% da variação total da resposta no sistema RGB, que resulta em maior sensibilidade analítica. Além disso, com as medidas analíticas baseadas na descoloração da solução de NET, as diferenças inerentes de absorvidade molar dos complexos não afetam a resposta analítica, o que é vantajoso para a quantificação da quantidade total de Ca e Mg. Dessa forma, as intensidades da radiação refletida, medidas em valores de R, foram consideradas como sinal analítico e diretamente correlacionadas com a concentração de Ca e Mg em biodiesel.

Figura 22. Espectros de absorção da solução de NET (a) e do complexo $[\text{Ca}(\text{NET})_2]^{4-}$ (b). São indicadas as faixas espectrais cobertas pelos canais B e R do sistema RGB. A fotografia inserida refere-se aos tubos de medida contendo I) solução de NET e II) solução de NET mais complexo $[\text{Ca}(\text{NET})_2]^{4-}$



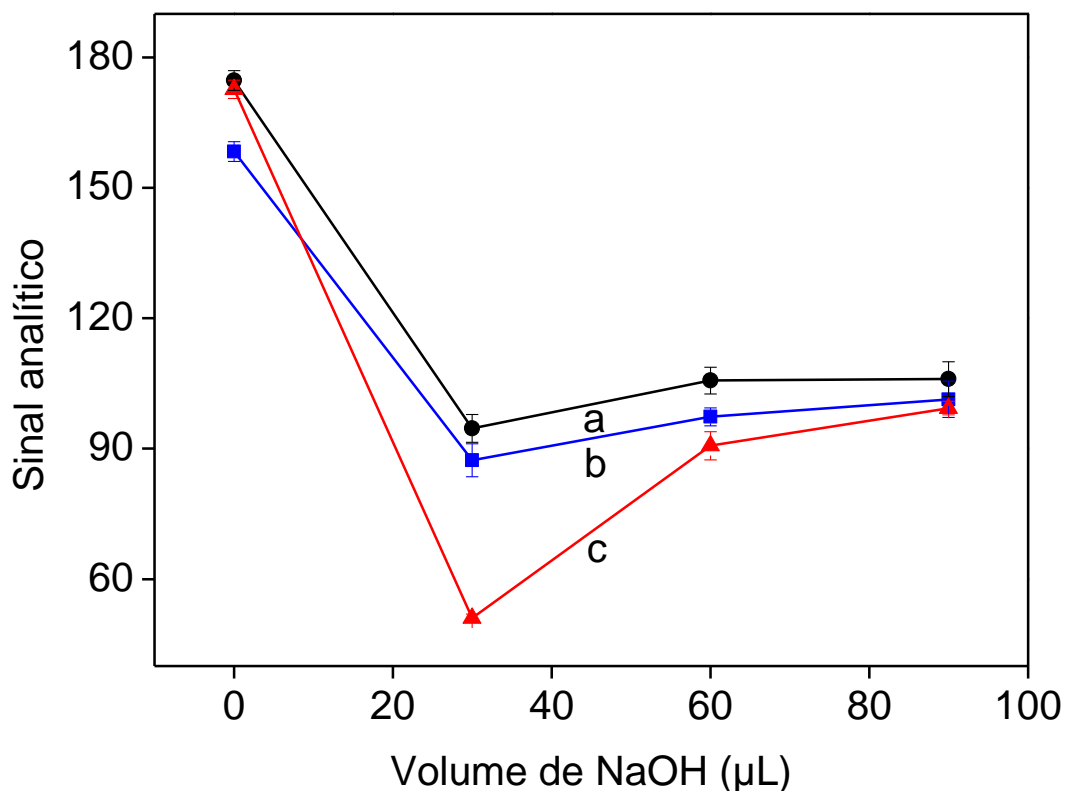
Foi inicialmente avaliada a viabilidade de utilizar uma solução ácida para a extração do Ca e do Mg das amostras de biodiesel, porém foi observada a formação de emulsão, dificultando a separação de fases. Diante disso, para evitar a morosa extração dos analitos, foi utilizado o etanol anidro como solvente mediador, visando formar uma única fase entre a amostra e os reagentes. Para a formação do sistema em fase única, as soluções de NET e NaOH foram preparadas em meio etanólico e as amostras de biodiesel foram diluídas 1:5 v/v nesse solvente. A diluição da amostra também contribui para minimizar efeitos de matriz, o que é importante devido às diferentes matérias-primas utilizadas para a produção do biodiesel.

4.3.2. Otimização

O procedimento foi otimizado pelo método univariado, com o objetivo de maximizar a resposta analítica e reduzir o consumo de reagentes e a geração de resíduos. Foram avaliados os efeitos dos volumes de amostra, das soluções de NaOH e de NET e do tempo de reação. Com base em experimentos preliminares, foram fixadas as concentrações de NaOH 50 mmol L⁻¹ e NET 2,0 mmol L⁻¹ e os experimentos foram realizados com 300 µmol L⁻¹ Mg²⁺ e 300 µmol L⁻¹ Ca²⁺. Devido às respostas analíticas serem baseadas na descoloração da solução de NET foi utilizado um excesso do reagente.

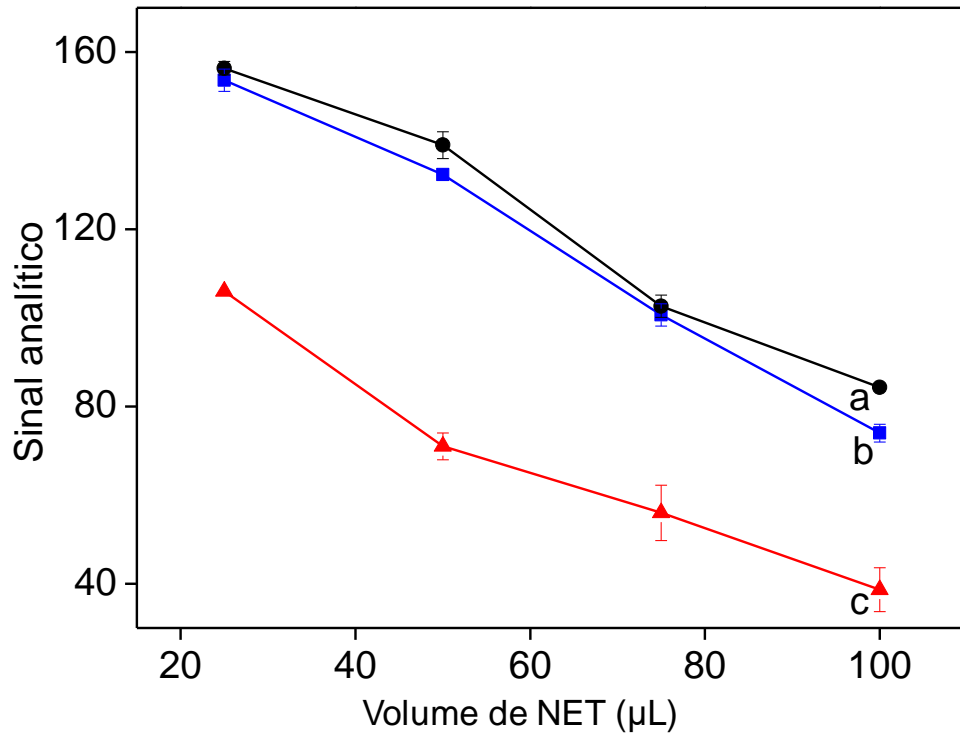
A otimização da quantidade de NaOH (Figura 23) é importante, pois é necessário trabalhar na faixa de pH 6,3 – 11,6, para favorecer a formação do complexo do NET com os analitos e assegurar a predominância do complexante na forma (HNET²⁻, azul), promovendo a mudança de coloração da solução com a formação dos complexos. A maior diferença entre os sinais analítico e de referência foi alcançada com 30 µL de solução de NaOH 50 mmol L⁻¹. Com volumes menores, o pH do meio se encontrava muito próximo de 6,3 e volumes maiores resultaram em pH maior do que 11, o que ocasionou a diminuição do sinal analítico, devido à precipitação dos analitos como hidróxidos. O pH do biodiesel é ca. 6,0 (126), o que torna necessária a adição de 60 µL de NaOH 50 mmol L⁻¹ para ajustar o pH na faixa de 6,3-11,6. Para evitar a adição de volumes distintos de solução de NaOH nas amostras e padrões, foi avaliado o ajuste de pH com soluções tampão amônia/amônio e tris(hidroximetil)aminometano/HCl, preparadas em etanol, mas essas não foram efetivas para o ajuste de acidez à faixa apropriada.

Figura 23. Efeito do volume de solução de NaOH na resposta analítica: (a) Mg $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) Ca $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) referência. Condições experimentais: $100 \mu\text{L}$ de amostra, $700 \mu\text{L}$ de etanol, concentração de NaOH: $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $75 \mu\text{L}$ de NET $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e tempo de reação de 10 min. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



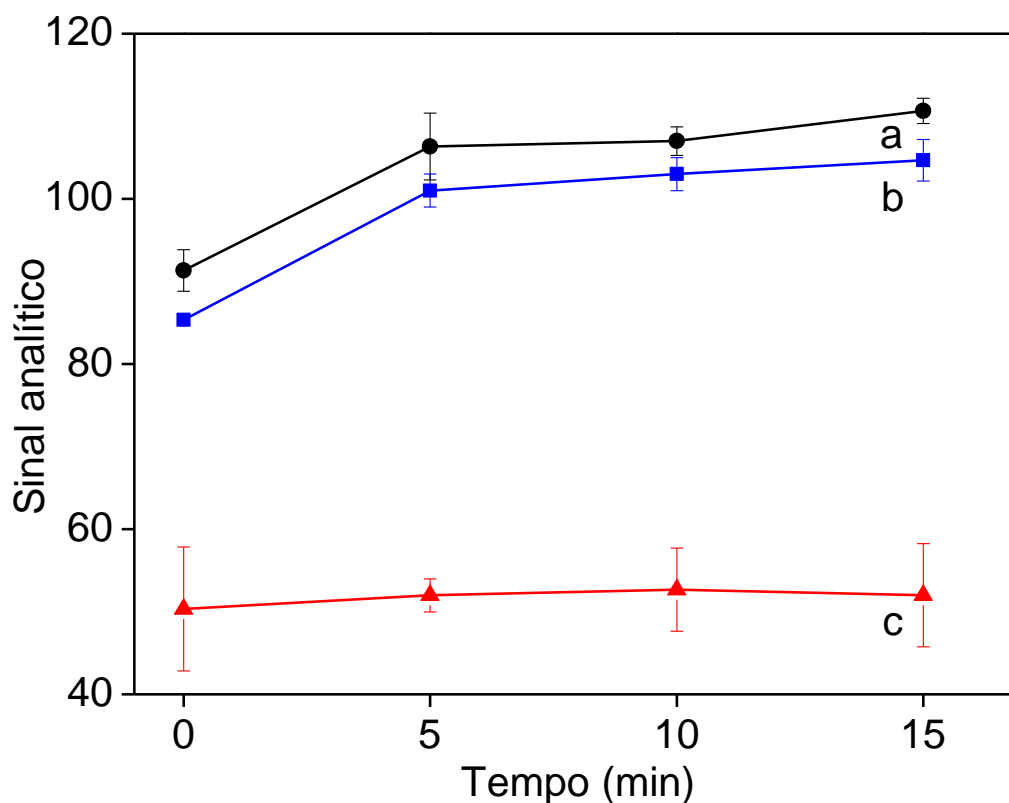
O efeito do volume da solução de NET $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi avaliado visando assegurar o excesso de reagente necessário para a formação dos complexos e medida analítica (Figura 24). Volumes menores que $25 \mu\text{L}$ não foram avaliados, com o intuito de minimizar riscos de erros sistemáticos. Embora uma resposta mais alta tenha sido obtida para $50 \mu\text{L}$, uma maior diferença entre os sinais analítico e de referência foi observada com $25 \mu\text{L}$. Então, foi definido $25 \mu\text{L}$ como volume ótimo, pois essa condição já assegurava um excesso de 2 vezes do reagente em relação ao analito, quantidade remanescente para as medidas analíticas e diferença significativa entre os sinais analítico e referência.

Figura 24. Efeito do volume de solução de NET na resposta analítica: (a) Mg $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) Ca $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) referência. Condições experimentais: $100 \mu\text{L}$ de amostra, $700 \mu\text{L}$ de etanol, $30 \mu\text{L}$ de NaOH $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$, NET $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e tempo de reação de 10 min. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



Volumes de amostra de 100 e $150 \mu\text{L}$ (diluída 1:5 v/v em etanol) foram avaliados visando maximizar a resposta analítica. Foi definido o volume de $150 \mu\text{L}$ como ótimo, pois a sensibilidade aumentou 30%. Volumes maiores que $150 \mu\text{L}$ de biodiesel não foram avaliados, porque dificultava a formação do sistema de fase única proposto, utilizando o etanol como solvente mediador. O efeito do tempo de reação (Figura 25) foi avaliado para assegurar que as medidas analíticas fossem realizadas em situação de estado estacionário, assim minimizando erros sistemáticos, situação observada a partir de 5 min.

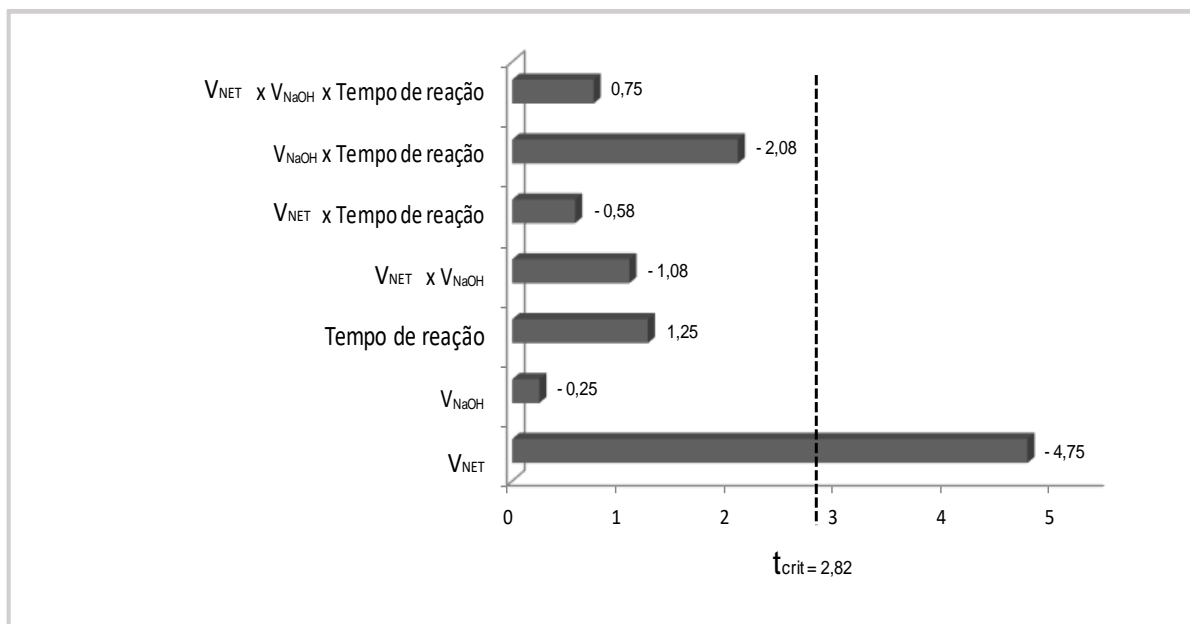
Figura 25. Efeito tempo de reação na resposta analítica: (a) Mg $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) Ca $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) referência. Condições experimentais: $100 \mu\text{L}$ de amostra, $700 \mu\text{L}$ de etanol, $30 \mu\text{L}$ de NaOH $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $25 \mu\text{L}$ de NET $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



4.3.3. Avaliação de robustez

Para avaliar a robustez do procedimento desenvolvido, foi aplicado um planejamento fatorial completo 2^3 , utilizando como variáveis os volumes da solução de NET e de NaOH e o tempo de reação. Os níveis das variáveis foram definidos variando as condições ótimas ($25 \mu\text{L}$ de NET $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $30 \mu\text{L}$ de NaOH 50 mmol L^{-1} e tempo de reação de 5 min) em 5%. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que, a nível de 95% de confiança, o efeito do volume da solução de NET é significativo, conforme mostra o gráfico de Pareto (Figura 26). Isso indica que variações no volume da solução de NET afetam a resposta analítica e que essa variável deve ser cuidadosamente controlada. Os efeitos das demais variáveis não foram significativos, indicando a robustez do procedimento.

Figura 26. Gráfico de Pareto referente ao planejamento fatorial completo 2^3 para avaliação de robustez do procedimento desenvolvido



4.3.4. Características analíticas

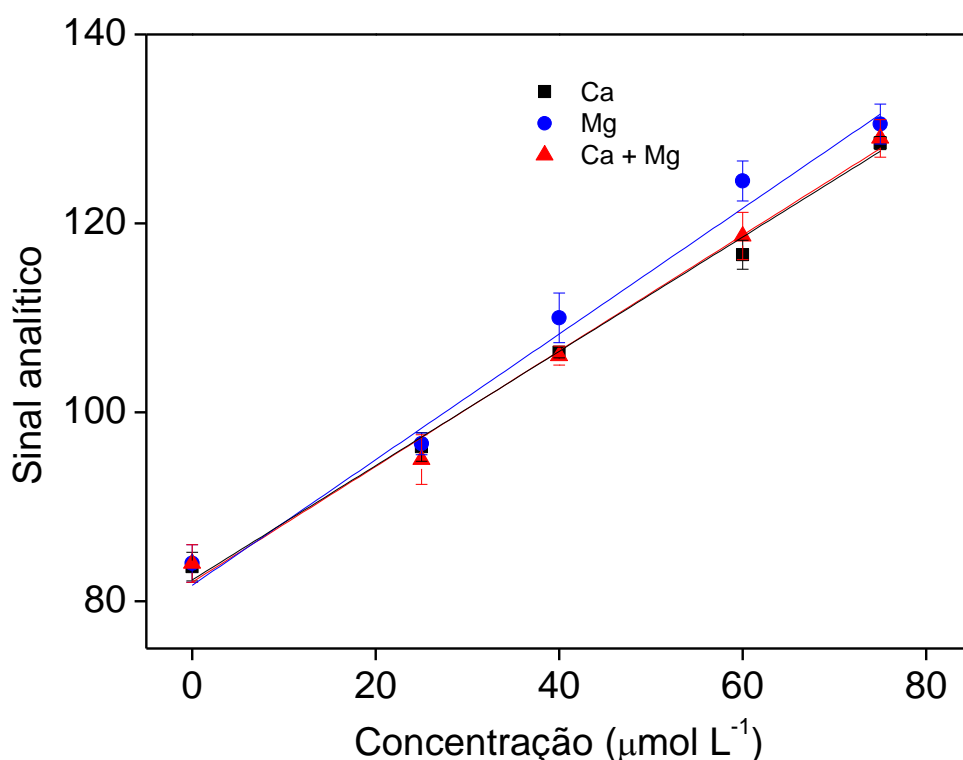
Nas condições otimizadas, foram obtidos CV de 1,0% ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$ Ca, $n=10$) e LD de $3 \mu\text{mol L}^{-1}$, estimado como a menor concentração de analito que produziu uma resposta analítica significativamente diferente do sinal de referência (ou seja, o valor R obtido na ausência dos analitos) com 95% de confiança. Esse LD é concordante com o valor estimado a partir dos parâmetros de regressão linear ($2,97 \mu\text{mol L}^{-1}$) (127). A resposta analítica foi linear de $10\text{--}75 \mu\text{mol L}^{-1}$ (equivalente a $2,3\text{--}17 \text{mg kg}^{-1}$ Ca ou $1,4\text{--}10 \text{mg kg}^{-1}$ Mg em biodiesel), descrita pela equação $R = 0,612C + 93,1$ ($r = 0,999$). A linearidade da curva de calibração foi confirmada pelo teste *lack-of-fit* (128) com nível de confiança 95%, resultando em $F_{cal} = 2,70$ ($F_{tab} = 3,71$). A reprodutibilidade (precisão interdia) foi avaliada a partir de curvas de calibração obtidas em diferentes dias ($n = 7$), resultando em variações dos coeficientes angulares de 3,5%. O procedimento consome apenas $25 \mu\text{g}$ de NET e $120 \mu\text{g}$ de NaOH e gera ca. $935 \mu\text{L}$ de resíduo por análise.

Foi avaliado o efeito de outros componentes da amostra e íons metálicos na quantificação de Ca ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) e Mg ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$). Considerando uma variação de sinal inferior a 5%, glicerol, metanol e água não interferiram nos limites máximos permitidos em biodiesel (200mg kg^{-1} , 2000mg kg^{-1} e 500mg kg^{-1} (8), respectivamente) (8). Na^+ e K^+ não interferiram em excesso de até 100 vezes; Zn^{2+} e

Cu^{+2} em excesso de até 50 vezes e Ni^{+2} em excesso de até 20 vezes em relação à concentração do analito. Efeitos mais críticos foram observados para Fe^{+2} e Fe^{+3} , que são tolerados em excesso de até 3 vezes em relação aos analitos. Todos esses íons metálicos são tolerados em concentrações significativamente maiores do que as esperadas em biodiesel (8).

As curvas de calibração construídas usando soluções padrão preparadas a partir de Ca, Mg ou Ca mais Mg em quantidades equimolares (Figura 27) mostraram parâmetros de regressão linear semelhantes, ou seja, Ca: $R = (0,61 \pm 0,02)C + (82,0 \pm 1,2)$; Mg: $R = (0,62 \pm 0,02)C + (84,4 \pm 0,9)$; Ca+Mg: $R = (0,61 \pm 0,03)C + (82,2 \pm 1,4)$. Como as inclinações não são estatisticamente diferentes, uma curva de calibração construída com soluções padrão preparadas a partir de um analito pode ser utilizada para quantificar ambas as espécies ou a quantidade total, conforme estabelecido pela legislação (8).

Figura 27. Curvas de calibração construídas com soluções padrão de Ca, Mg e Ca + Mg em quantidades equimolares



Recuperações de 90 a 104% foram obtidas para amostras de biodiesel produzidas a partir de diferentes matérias-primas, enriquecidas com Ca (Tabela 6). Adicionalmente, recuperações de Ca e Mg de 96 a 120% foram estimadas em diferentes amostras comerciais de biodiesel (Tabela 7), o que indica a ausência de efeitos de matriz.

Para avaliar a exatidão, Ca e Mg foram adicionados às amostras e as concentrações obtidas pelo procedimento proposto e de referência (117) (Tabela 8) foram comparadas pelo teste *t* pareado. O valor obtido (0,74) foi menor que o valor crítico (2,35), indicando que os resultados são concordantes a nível de 95% de confiança.

Tabela 6. Recuperações de Ca adicionado em amostras de biodiesel obtidas de diferentes matérias-primas

Matéria-prima ^a	Ca ($\mu\text{mol L}^{-1}$) [*]		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
Soja/algodão (90/10)	100	104 ± 10	104 ± 10
	300	287 ± 25	96 ± 8
Soja (100)	100	90 ± 8	90 ± 8
	300	287 ± 20	96 ± 7
Soja/sebo (70/30)	300	296 ± 17	99 ± 6

^aAmostras diluídas 5 vezes conforme descrito na seção 4.2.3; ^{*}Média ± desvio padrão (n = 3)

Tabela 7. Recuperações de Ca e Mg em amostras de biodiesel. Amostras com adições de Ca 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (amostra 1) e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (amostra 2) ou Mg 170 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (amostras 3-5) e 340 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (amostra 6) e com quantidades equimolares de Ca e Mg (amostras 7-10)

Amostra ^a	Ca ou Mg ($\mu\text{mol L}^{-1}$)*		Recuperado (%)
	Adicionado	Encontrado	
1	100	111 \pm 9	111 \pm 9
2	300	359 \pm 33	120 \pm 11
3	170	185 \pm 2	109 \pm 5
4	170	195 \pm 2	115 \pm 1
5	170	163 \pm 9	96 \pm 5
6	340	335 \pm 22	99 \pm 6
7	170/170 ^b	351 \pm 31	103 \pm 9
8	150/150 ^b	275 \pm 31	92 \pm 10
9	150/150 ^b	302 \pm 23	101 \pm 8
10	100/100 ^b	208 \pm 6	104 \pm 3

^aAmostras diluídas 5 vezes conforme descrito na seção 4.2.3; b. Quantidades equimolares de Ca e Mg.
*Média \pm desvio padrão (n = 3)

Tabela 8. Quantificação de Ca e Mg em biodiesel pelos procedimentos proposto e de referência. Amostras com adições Ca 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (amostra 1 e 2) ou Mg 300 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (amostra 3 e 4)

Amostra ^a	Ca e Mg ($\mu\text{mol L}^{-1}$)*	
	Procedimento proposto	Procedimento de referência (117)
1	324 \pm 1	235 \pm 1
2	330 \pm 3	302.6 \pm 0.2
3	325 \pm 2	370.8 \pm 0.5
4	529 \pm 3	517 \pm 1

^aAmostras diluídas 5 vezes conforme descrito na seção 4.2.3. *Média \pm desvio padrão (n = 3)

Algumas características de procedimentos propostos para a quantificação de Ca e Mg em biodiesel são mostradas na Tabela 9. Os procedimentos baseados em ICP OES (116–118) e especialmente em ICP-QMS/QMS (120) requerem equipamentos de alto custo, além de estratégias laboriosas para o preparo da amostra e solventes tóxicos, como xileno (120), isopropanol (122) e clorofórmio (123). Já o procedimento proposto utiliza somente etanol, que é um solvente amplamente disponível, de menor custo e mais ambientalmente amigável. O procedimento proposto possui um limite de quantificação (LQ) maior do que os procedimentos citados na Tabela 9, porém atende ao limite estabelecido pela ANP (5 mg kg^{-1}) (8). A precisão do procedimento proposto é melhor que as reportadas nos procedimentos listados na Tabela 9 (116–124). O procedimento desenvolvido é também atrativo considerando o baixo consumo de reagentes e solventes, praticidade/simplicidade de execução e o uso de instrumentação de baixo custo e fácil acesso.

Tabela 9. Características analíticas de procedimentos para a quantificação de Ca e Mg em biodiesel

Procedimento	Resposta linear (mg kg ⁻¹)		LD (mg kg ⁻¹)		CV (%)	Reagentes/preparação de amostra	Referência
	Ca	Mg	Ca	Mg			
APE/ICP OES	0,5–13,0	0,5–13,0	0,06	0,05	< 2	HNO ₃	(116)
Emulsão/ICP OES	–	–	–	–	< 8	HNO ₃ e Triton X-100	(117)
Digestão-microondas/ICP OES	–	–	0,40	0,02	–	HNO ₃ e H ₂ O ₂	(118)
Bloco de digestão/ICP OES	–	–	0,78	0,04	–	HNO ₃ , H ₂ SO ₄ e H ₂ O ₂	(118)
Quebra de emulsão/ICP OES	0,5–2,0	0,1–0,5	0,016	0,0045	18	HNO ₃ e Triton X-114	(119)
Diluição/ICP-QMS/QMS	–	–	0,0001 2	0,0000 4	2.5	Xileno	(120)
Microemulsão/FAAS	–	–	0,125	0,034	4	HNO ₃ e Triton X-100	(121)
Microextração líquido-líquido em Fluxo/Espectrofotometria	2,0–20,0	1,2–12	0,6	0,4	5	Isopropanol	(122)
Emulsão/Dispositivo colorimétrico em papel	1,0–15,0	1–15	0,3	0,3	12	Acetato de amônio (pH = 4.73)	(124)
Eletroforese capilar	0,25–5,00	0,25–5,0	0,06	0,02	< 5	HNO ₃ e clorofórmio	(123)
Este trabalho	0,40–3,00	0,24–1,8	0,12	0,07	1,0	Etanol	–

APE: Extração por fase de aerossol; FAAS: Espectrometria de absorção atômica com chama.

4.4. Conclusões

O procedimento analítico proposto é inovador por viabilizar a quantificação de Ca e Mg em biodiesel, sem o procedimento de extração, explorando um sistema de fase única. Também se destaca pela simplicidade, praticidade e portabilidade devido à detecção por DIP obtidas com um *smartphone*, e por ser um procedimento analítico limpo, por utilizar pequenas quantidades de reagentes e, conseqüentemente, ter baixa geração de resíduos. Além disso, utiliza somente etanol para diluir a amostra e preparar as soluções padrão para calibração externa, não sendo observados efeitos de matriz. Outros componentes da amostra (glicerol, metanol e água) e outros íons metálicos (Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+}) não interferem na quantificação de Ca e Mg, mesmo em quantidades superiores às esperadas no biodiesel. A robustez do procedimento proposto foi demonstrada pela precisão interdia, com variações de inclinação aceitáveis (menores que 3,5%). As características analíticas (linearidade, LQ, exatidão e precisão) indicam que o procedimento proposto é uma alternativa viável e atraente para a quantificação de Ca e Mg em biodiesel.

5. Calibração multi-energia para contornar efeitos de matriz na quantificação de índice de iodo e glicerol livre em biodiesel ⁴

Resumo

O risco de efeitos de matriz na análise de biodiesel é significativo, pois produtos de diferentes matérias-primas ganharam mercado mundial. A calibração multi-energia é uma estratégia já explorada com sucesso para minimizar efeitos de matriz em análises elementares e tem grande potencial para aplicações envolvendo espectrofotometria molecular. Neste capítulo da Tese, propõe-se o desenvolvimento de procedimentos espectrofotométricos com calibração multi-energia para a quantificação de índice de iodo e glicerol livre em biodiesel produzido de diferentes matérias-primas, visto que efeitos de matriz foram previamente observados em procedimentos espectrofotométricos para a quantificação desses parâmetros. A estratégia apresentou resultados mais exatos, com valores de raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP, do inglês *Root mean square error of prediction*) de 6,0 para índice de iodo e 8,0 para glicerol livre, em comparação a calibração externa (RMSEP de 45,6 para glicerol livre e 18,8 para índice de iodo) e o procedimento de adições de padrão (RMSEP de 25,3 para glicerol livre e 21,1 para índice de iodo). Além disso, os resultados concordaram com os obtidos pelo procedimento de referência a nível de confiança de 95%, o que não foi observado para calibração externa (glicerol livre) e procedimento das adições de padrão (índice de iodo). CV ($n = 8$) e LD (99,7% de confiança nível) foram estimados em 1,7% e 5 g I₂/100 g (índice de iodo) e 3,0% e 10 mg kg⁻¹ (glicerol livre), que são comparáveis ou melhores do que os obtidos nos procedimentos propostos anteriormente. Assim, a estratégia de calibração é uma alternativa viável para o controle de qualidade do biodiesel, com destaque por superar efeito de matriz, simplicidade, praticidade e por atender aos requisitos da química verde.

Palavras-chave: Espectrofotometria UV-Vis. Efeitos de matriz. Procedimentos de calibração. Transesterificação.

⁴ SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Multi-energy calibration to circumvent matrix effects in the determination of biodiesel quality parameters by UV-Vis spectrophotometry. *Talanta*, v. 209, art. 120584, 2020.

Abstract

In biodiesel analysis, the risk of matrix effects in analytical procedures for quality control has increased, as products from different raw materials have gained the world market. The multi-energy calibration (MEC), successfully exploited to minimize matrix effects in spectrometric elemental analysis, has also a great potential for applications involving molecular spectrometry. This Thesis chapter describes the exploitation of MEC in spectrophotometric procedures to quantify iodine index and free glycerol in biodiesel produced from different raw materials. The strategy yielded more accurate results (RMSEP values of 6.0 for iodine index and 8.0 for free glycerol) than both external standard calibration (RMSEP of 45.6 for free glycerol and 18.8 for iodine index) and the standard additions method (RMSEP of 25.3 for free glycerol and 21.1 for iodine index). Moreover, results agreed with those obtained by the reference procedures at the 95% confidence level, which was not observed for external standard calibration (free glycerol quantification) and for the standard additions method (iodine value quantification). CV ($n = 8$) and LD (99.7% confidence level) were estimated at 1.7% and 5 g I₂/100 g (iodine value) and 3.0% and 10 mg kg⁻¹ (free glycerol), which are comparable to or better than those achieved by using previously proposed methods. Thus, the calibration strategy is a viable alternative for biodiesel quality control, circumvent matrix effect, with simplicity, practicality, and environmental friendliness.

Keywords: UV–Vis spectrophotometry. Matrix effects. Calibration methods. Transesterification.

5.1. Introdução

Diferentes estratégias de calibração são utilizadas em análises químicas instrumentais, com destaque para a calibração externa (EC, do inglês *External standard calibration*), usualmente com compatibilização de matriz, e o método de adição de padrão (SAM, do inglês *Standard additions method*). EC é a estratégia mais usual, quando não existem evidências de efeitos de matriz, ou quando é possível a compatibilização de matriz, *i.e.* preparar soluções padrão simulando a matriz da amostra (129). Porém, nem sempre isso é possível e usualmente não se conhece a composição da amostra ou a matriz varia dentro de um mesmo lote de amostras (130). O método SAM é o mais utilizado para contornar efeitos de matriz, sendo usual na análise de amostras complexas. Essa estratégia de calibração consiste em preparar as soluções padrão diretamente no meio da amostra, mantendo a fração volumétrica da amostra constante, assegurando que todas as soluções tenham a mesma composição de matriz. A curva de calibração é construída com as respostas analíticas (eixo y) em função da concentração do analito adicionada na amostra (eixo x) e a concentração do analito é determinada por extrapolação (131). Porém, o método SAM é uma estratégia morosa e, diante disso, novas estratégias de calibração têm sido propostas para superar efeitos de matriz e para obter resultados analíticos confiáveis. Nesse contexto, destaca-se uma estratégia relativamente recente, denominada calibração multi-energia (MEC), discutida em maiores detalhes no item 1.4 desta Tese. MEC tem sido aplicada com sucesso a diversas técnicas espectrométricas atômicas (96,97,99,132) e, recentemente, a estratégia foi aplicada em espectrometria molecular UV-Vis e fluorescência (102), utilizando soluções modelo. Nesse trabalho, destacou-se a necessidade de estudos adicionais para avaliar a aplicabilidade do MEC em amostras com matrizes complexas.

Devido à variedade de matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel, alguns procedimentos analíticos, especialmente aqueles envolvendo espectrofotometria UV-Vis, requerem estratégias laboriosas para contornar efeitos de matriz. Esse é o caso do procedimento para a quantificação de índice de iodo, em que são necessárias informações sobre a matéria-prima e proporções utilizadas na produção do biodiesel para a compatibilização de matriz (4). Da mesma forma, a quantificação de glicerol livre é realizada pelo método SAM visando contornar efeitos de matriz (6).

Considerando os efeitos de matriz observados em procedimentos espectrofotométricos para o controle de qualidade de biodiesel, a estratégia MEC foi avaliada para contornar os efeitos de matriz na quantificação de índice de iodo (4) e de glicerol livre (6) em biodiesel. O índice de iodo se refere ao grau de insaturação dos ésteres alquílicos do biodiesel e está relacionado à estabilidade do biocombustível à oxidação, já o glicerol é um subproduto da reação de transesterificação e a sua concentração no biodiesel é um importante parâmetro de qualidade. Acima de 200 mg kg⁻¹ glicerol, podem ocorrer danos ao motor e emissão de gases tóxicos à atmosfera (2).

5.2. Parte experimental

5.2.1. Equipamentos e acessórios

Os procedimentos analíticos foram realizados em tubos Falcon[®] de 15 mL. Um vortex (Nova instruments/1800 rpm) com capacidade para 9 tubos Falcon[®] de 15 mL e uma centrífuga (Quimis, model 6222T108) foram utilizados para favorecer a mistura e a separação das fases.

Os espectros de absorção UV-Vis foram adquiridos com espectrofotômetro multicanal (Ocean Optics[®], EUA) com uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

5.2.2. Reagentes e soluções

Soluções foram preparadas utilizando reagentes e solventes de grau analítico e água deionizada (resistividade > 18 MΩ cm), em balões volumétricos.

Para a quantificação de glicerol livre em biodiesel, a solução tampão acetato/ácido acético (pH 5,5) foi preparada pela diluição de 25 mL de ácido acético glacial (99,7%) e dissolução de 38,5 g de acetato de amônio (Merck) em 250 mL de água deionizada. Soluções de acetilacetona 1,0 mol L⁻¹ (Sigma-Aldrich) e metaperiodato de sódio 0,020 mol L⁻¹ (Merck) foram preparadas pela dissolução de 5,000 g e 0,214 g dos reagentes em 50 mL de tampão acetato, respectivamente. A solução de acetilacetona foi preparada 2 h antes de ser utilizada. Solução estoque de glicerol 10 g L⁻¹ foi preparada por diluição do reagente 85 %(m/v) (Merck) em etanol, e a solução padrão de glicerol 250 mg L⁻¹ foi preparada pela diluição da solução estoque também em etanol.

Soluções padrão de glicerol ($20\text{--}220\text{ mg L}^{-1}$) utilizadas nos métodos EC e SAM foram preparadas a partir da diluição da solução estoque em etanol.

Para a quantificação de índice de iodo em biodiesel, a solução de triiodeto $0,6\text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de 15 mg de I_2 (Merck) em 15 mL de etanol, seguida da adição de $1,7\text{ g}$ de iodeto de potássio (Sigma-Aldrich), avolumando para 100 mL com água. Como um padrão de índice de iodo em biodiesel não está disponível comercialmente, foi utilizado um biodiesel de referência, cujo valor de índice iodo ($100\text{ g I}_2/100\text{ g}$) foi determinado pelo procedimento volumétrico de referência (12). Hexano foi utilizado em substituição à amostra/biodiesel padrão para a medida do sinal de referência.

As soluções padrão utilizadas nos métodos de EC e SAM ($15\text{ a }100\text{ g I}_2/100\text{ g}$) foram preparadas a partir da diluição do biodiesel padrão em hexano.

Amostras de biodiesel de diferentes matérias-primas (óleos de soja e algodão e gordura animal) foram obtidas diretamente das usinas de produção.

5.2.3. Procedimentos

Ambos os procedimentos foram conduzidos em tubos Falcon® de 15 mL .

Para a quantificação de glicerol livre em biodiesel por MEC, a solução 1 foi preparada pela mistura de $50\text{ }\mu\text{L}$ de biodiesel e $50\text{ }\mu\text{L}$ da solução padrão de glicerol 250 mg L^{-1} , e a solução 2 pela mistura de $50\text{ }\mu\text{L}$ de biodiesel e $50\text{ }\mu\text{L}$ de etanol. Posteriormente, foi adicionado $200\text{ }\mu\text{L}$ da solução de metaperiodato de sódio 20 mmol L^{-1} e a mistura foi agitada utilizando um vortex por 5 min , para extração do glicerol livre do biodiesel para a fase aquosa e oxidação a formaldeído. Após agitação, sem a remoção da fase orgânica, $500\text{ }\mu\text{L}$ da solução de acetilacetona $1,0\text{ mol L}^{-1}$ e $2,5\text{ mL}$ de água foram adicionados. Depois de 10 min de reação, a mistura foi centrifugada por 2 min para separação das fases. A fase aquosa foi removida com uma pipeta e transferida para uma cubeta. A medida do produto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina foi realizada em um espectrofotômetro UV-Vis, entre $420\text{--}490\text{ nm}$ ou nos comprimentos de onda de $410, 430, 440, 450$ e 460 nm , tomando como referência uma solução obtida de forma análoga, porém substituindo a amostra de biodiesel por etanol.

As amostras também foram analisadas pelos métodos EC e SAM sob condições de reação semelhantes (diluição da amostra, volumes de reagentes e tempos de reação), mas usando 100 µL de amostra ou soluções padrão de glicerol para o método EC e 50 µL de amostra de biodiesel mais 50 µL de soluções padrão de glicerol para o método SAM. As medidas de absorvância foram realizadas em 410 nm.

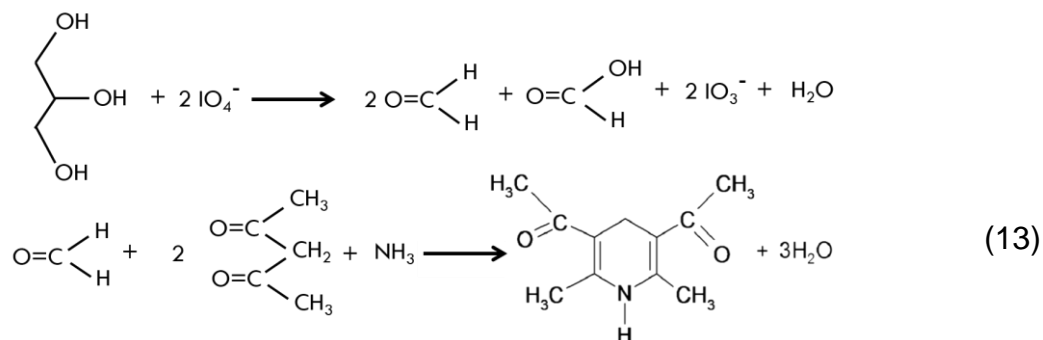
Para a quantificação de índice de iodo, a solução 1 foi preparada pela mistura de 250 µL de amostra de biodiesel, 250 µL de hexano e 500 µL do biodiesel de referência; a solução 2 foi preparada pela mistura de 250 µL de biodiesel e 750 µL de hexano. Posteriormente, foi adicionado 1,3 mL da solução aquosa de triiodeto e os tubos foram agitados por 5 min para extração do I₂ para a fase orgânica e reação com os compostos insaturados. Subsequentemente, a mistura foi centrifugada por 2 min para separar as fases, a fase aquosa foi retirada com uma pipeta e transferida para uma cubeta para a medida espectrofotométrica entre 390-460 nm ou nos comprimentos de onda de 430, 440, 450, 460 e 470 nm. Em cada comprimento de onda, os sinais analíticos obtidos para as soluções 1 e 2 foram subtraídos dos sinais obtidos de uma solução preparada de forma análoga, porém substituindo a amostra de biodiesel por hexano (referência).

As amostras também foram analisadas pelos métodos EC e SAM sob condições de reações semelhantes (diluição da amostra, volumes de reagentes e tempos de reação) ao procedimento proposto. Os procedimentos utilizaram 1000 µL de amostra ou soluções padrão (EC) ou 250 µL de amostra mais 750 µL de solução padrão (SAM). Os valores de índice de iodo para as soluções padrão variaram de 15–100 g de I₂/100 g e as absorvâncias foram medidas em 430 nm.

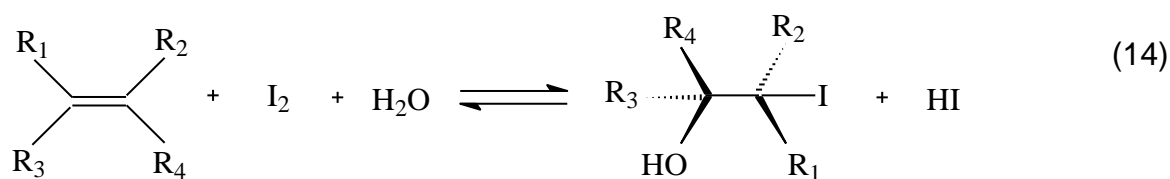
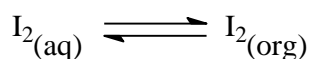
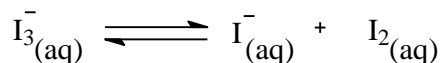
5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Aspectos gerais

A quantificação do glicerol livre foi baseada na oxidação do analito a formaldeído, que reage com acetilacetona, formando um produto de cor amarela (3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina) (6), Eq. 13.



A quantificação de índice de iodo foi baseada na descoloração de uma solução aquosa de triiodeto (4), adicionada diretamente ao biodiesel, devido à halogenação dos compostos insaturados presentes no biodiesel (Eq. 14). Como estes compostos insaturados apresentam baixa solubilidade em água, a reação ocorre na fase orgânica e é favorecida porque o iodo é solúvel no biodiesel. Portanto, a quantidade remanescente na fase aquosa é inversamente proporcional ao consumo de iodo na reação de halogenação.



5.3.2. Otimização

5.3.2.1. Quantificação de glicerol livre

O procedimento para a quantificação de glicerol livre em biodiesel foi otimizado pelo método univariado, com o objetivo de maximizar a resposta analítica e minimizar o consumo de reagentes. Foram otimizados o volume de amostra e os tempos de

extração e reação (oxidação do glicerol a formaldeído e formação do 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (6)), Eq. 13. Baseado em experimentos preliminares, foram fixados os volumes e as concentrações dos reagentes (200 μL de metaperiodato de sódio 20 mmol L^{-1} e 500 μL de acetilacetona 1,0 mol L^{-1}).

A primeira etapa do procedimento proposto refere-se à extração do glicerol livre, que é favorecida por sua alta solubilidade em água (500 g L^{-1} a 20 °C (111)), e posterior oxidação a formaldeído pelo metaperiodato em meio ácido, que é relativamente rápida (6). Na concentração de metaperiodato de 20 mmol L^{-1} , condição semelhante à utilizada no procedimento anterior (6), o estado estacionário foi alcançado após 5 min de agitação.

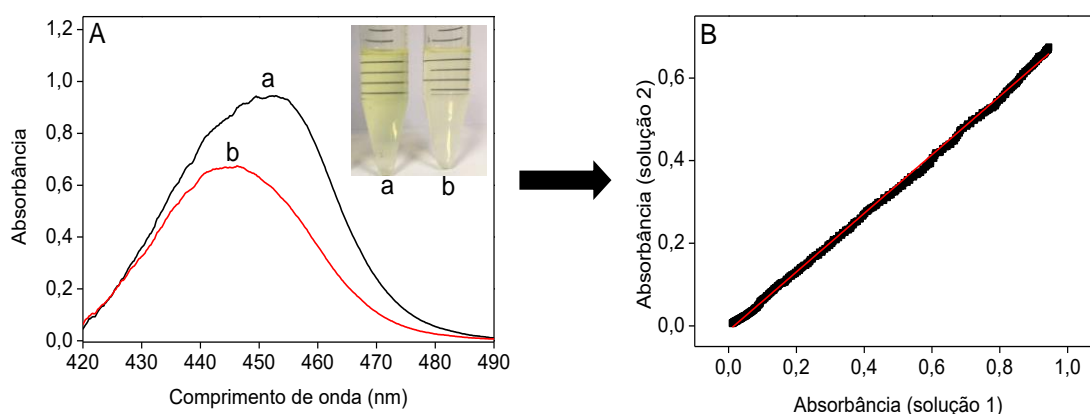
Resultados anteriores indicaram que a reação do formaldeído com acetilacetona é relativamente lenta em meio etanólico à temperatura ambiente, e que um estado estacionário não foi alcançado mesmo após 30 min de reação a 25 °C (6). Visando diminuir o tempo de análise e evitar o aquecimento para favorecer a reação, foi utilizado excesso de acetilacetona e a mistura foi diluída em água para diminuir a concentração de etanol. O efeito da concentração de acetilacetona foi significativo até 1,0 mol L^{-1} , o que proporciona o dobro da concentração no meio reacional utilizada anteriormente (6). A resposta analítica aumentou com o tempo de reação até 10 min, o que foi definido como condição ótima para estudos posteriores.

Como discutido na literatura para a calibração multi-isótopos (100,133), análoga ao MEC, resultados mais exatos são esperados quando as inclinações das curvas MEC (CA) estão entre (0,1 < CA < 0,9). Essa condição evita altas discrepâncias entre as concentrações de analito na amostra e na solução padrão (100,134). No presente trabalho, melhor exatidão foi alcançada quando as inclinações estavam entre 0,1 e 0,8. Assim, tomando as concentrações de glicerol livre esperadas nas amostras (ca. 200 mg L^{-1}), a concentração de glicerol na solução padrão foi fixada em 250 mg L^{-1} .

A Figura 28 ilustra a aplicação da estratégia MEC para a quantificação de glicerol livre em biodiesel. A Figura 28A mostra os espectros das soluções 1 e 2 após a formação do produto de medida. Um deslocamento do máximo de absorção pode ser observado devido ao efeito da absorção de radiação pela acetilacetona (mais significativo para a solução com menor concentração de glicerol, espectro a), porém isso não afetou a estratégia de calibração. Os valores de branco nos comprimentos de onda medidos variaram de 0,050 a 0,120. A curva MEC (Figura 28B) foi obtida a

partir da correlação dos valores de absorbância (S_2 versus S_1) na faixa de 420–490 nm, mas as respostas em 5 comprimentos de onda são suficientes para a quantificação do analito nas amostras.

Figura 28. Aplicação da estratégia MEC à quantificação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel. (A) espectros de absorção das fases aquosas das soluções 1 (a) e 2 (b). A inserção mostra as fotografias correspondentes às misturas antes da separação das fases. (B) Curva de calibração MEC para a quantificação do glicerol livre



5.3.2.2. Quantificação de índice de iodo

Para a quantificação de índice de iodo em biodiesel, as concentrações de cada reagente na solução de triiodeto (iodo e iodeto de potássio) e o efeito da diluição da amostra foram otimizados pelo método univariado, visando maximizar a resposta analítica e minimizar o consumo de reagente. Com base em experimentos preliminares, os tempos de agitação (extração do iodo para a fase orgânica visando à reação com os compostos insaturados) e de centrifugação (separação das fases orgânica e aquosa) foram fixados em 5 e 2 min, respectivamente. Os volumes de amostra e da solução de triiodeto também foram fixados em 0,5 e 1,3 mL, respectivamente.

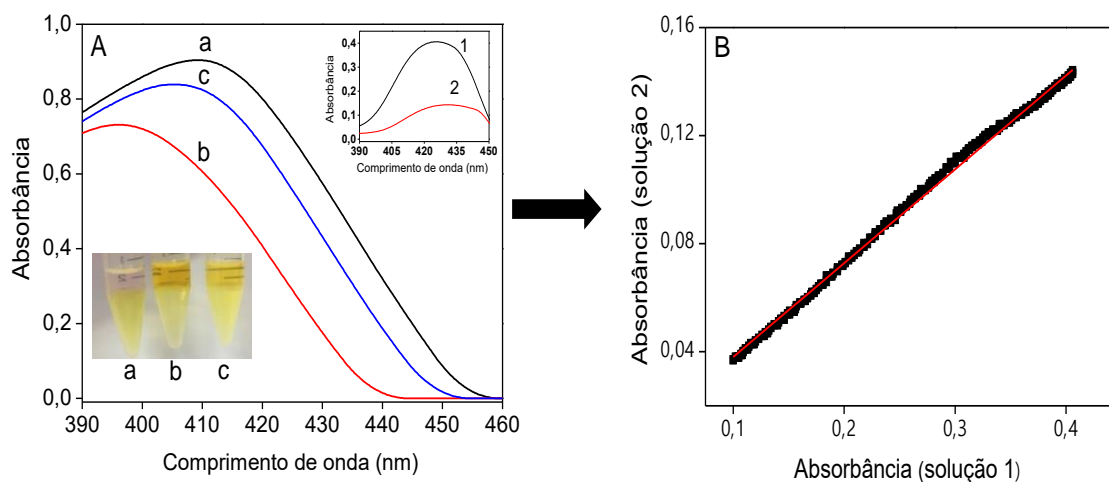
Os efeitos da concentração de iodeto de potássio e de iodo também são relevantes. A concentração de iodo afeta a eficiência da reação de halogenação e o excesso de reagente é necessário para assegurar quantidade remanescente para a medida espectrofotométrica. Por outro lado, a saturação do sinal de absorbância pode ser observada quando um grande excesso de iodo é usado. Nos estudos realizados, isso foi observado para concentrações maiores que $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ iodo.

O efeito da concentração de iodeto de potássio é relevante, pois afeta a extração do iodo para a fase orgânica, para reagir com os compostos insaturados, de acordo com a Eq. 14, e a extração do iodo remanescente para a fase aquosa, para a medida espectrofotométrica. Concentrações de iodeto de potássio maiores que 105 mmol L^{-1} desfavoreceram a extração do iodo para a fase orgânica para a reação de halogenação; em concentrações inferiores, foi desfavorecida a extração do iodo remanescente da fase orgânica para a fase aquosa. Diante disso, foram fixadas as concentrações de iodo $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ e iodeto de potássio 105 mmol L^{-1} .

Uma amostra de biodiesel de referência, cujo valor de iodo foi determinado como $100 \text{ g I}_2/100 \text{ g}$ (12), foi usada no método MEC. Os valores de índice de iodo em biodiesel podem chegar a $180 \text{ g I}_2/100 \text{ g}$, dependendo da matéria-prima utilizada na reação de transesterificação (135). Assim, as amostras foram previamente diluídas 1:1 v/v em hexano, o que gerou resultados mais exatos, conforme a discussão anterior, referente às inclinações das curvas MEC.

A Figura 29 ilustra a aplicação da estratégia MEC para a quantificação de índice de iodo em biodiesel. Como a resposta analítica se baseia na descoloração do triiodeto, os espectros de absorção para as soluções 1 e 2 foram obtidos por diferença do espectro de referência (Figura 29A, inserção). A curva MEC (Figura 29B) refere-se à correlação dos valores de absorbância (S_2 versus S_1) na faixa de 390–450 nm. Um tratamento de dados semelhante foi adotado para a quantificação de índice de iodo, a partir dos valores de absorbância obtidos em 5 comprimentos de onda (430, 440, 450, 460 e 470 nm).

Figura 29. Aplicação da estratégia MEC à quantificação espectrofotométrica de índice de iodo em biodiesel. (A) espectros de absorção de soluções aquosas de triiodeto após agitação com (a) hexano (espectro de referência), (b) amostra + padrão (solução 1) e (c) amostra + diluente (solução 2). A imagem inferior mostra fotografias dessas misturas. A inserção superior mostra as diferenças entre os espectros de absorção de (1) referência - solução 1 e (2) referência - solução 2. (B) Curva de calibração MEC para a quantificação de índice de iodo



5.3.3. Características analíticas

Utilizando as condições otimizadas, o CV ($n = 10$) e o LD (99,7% de confiança) foram estimados em 3,0% e 10 mg kg^{-1} para glicerol livre e 1,7% e $5 \text{ g I}_2/100 \text{ g}$ para índice de iodo em biodiesel. As faixas de resposta foram de $30\text{--}220 \text{ mg kg}^{-1}$ para glicerol livre e $15\text{--}100 \text{ g I}_2/100 \text{ g}$ para índice de iodo, que correspondem às inclinações das curvas MEC entre 0,1 e 0,5. A Tabela 10 mostra as equações lineares das curvas MEC obtidas na quantificação de índice de iodo e de glicerol livre em diferentes amostras de biodiesel.

Com o objetivo de avaliar a eficácia da estratégia MEC para contornar os efeitos da matriz, as amostras foram analisadas pelo método proposto e pelos métodos EC e SAM (Tabelas 11 e 12). A exatidão foi avaliada utilizando RMSEP, calculado conforme a Eq. 15, onde y é o valor medido, \hat{y} é o valor determinado pelo método de referência e n o número de amostras (136,137).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (15)$$

Os RMSEP para índice de iodo e glicerol livre determinados para EC (18,8 e 45,6) e SAM (21,1 e 25,3) foram significativamente maiores que os obtidos pela estratégia MEC para quantificação de índice de iodo (6,0) e glicerol livre (8,0), respectivamente.

Os resultados obtidos pelo procedimento proposto com MEC também foram comparados aos obtidos pelos procedimentos de referência, utilizando um teste *t* pareado. Os valores obtidos (2,6 para índice de iodo e 0,7 para glicerol livre) foram menores que o valor crítico (2,7), indicando concordância a nível de confiança de 95%. Por outro lado, os resultados obtidos na quantificação de índice de iodo pelo método SAM e de glicerol livre por EC não foram concordantes com os obtidos utilizando os procedimentos de referência, a nível de confiança de 95%. Diante disso, conclui-se que a estratégia MEC é eficiente para contornar os efeitos de matriz, permitindo a quantificação de índice de iodo e de glicerol livre em biodiesel obtidos de diferentes matérias-primas. Além disso, a estratégia MEC torna o procedimento mais prático por utilizar apenas 2 soluções para a calibração e quantificação do analito.

Tabela 10. Equações de calibração MEC para a quantificação de índice de iodo e de glicerol livre em amostras de biodiesel obtidas de diferentes matérias-primas

Biodiesel (matéria-prima)	Equações MEC			
	Índice de iodo		Glicerol livre	
70% óleo de soja/30% gordura animal	$A_2 = (0,349 \pm 0,003)A_1 - (0,014 \pm 0,001)$	$r = 0,999$	$A_2 = (0,217 \pm 0,004)A_1 + (0,0007 \pm 0,0012)$	$r = 0,998$
90% óleo de soja/10% óleo de algodão	$A_2 = (0,41 \pm 0,04)A_1 - (0,011 \pm 0,007)$	$r = 0,981$	$A_2 = (0,214 \pm 0,004)A_1 + (0,034 \pm 0,001)$	$r = 0,998$
90% óleo de soja /10% gordura animal	$A_2 = (0,334 \pm 0,007)A_1 - (0,011 \pm 0,002)$	$r = 0,998$	$A_2 = (0,245 \pm 0,008)A_1 - (0,009 \pm 0,002)$	$r = 0,997$
100% óleo de soja	$A_2 = (0,351 \pm 0,006)A_1 - (0,009 \pm 0,001)$	$r = 0,999$	$A_2 = (0,111 \pm 0,004)A_1 + (0,001 \pm 0,001)$	$r = 0,996$
93% óleo de soja/5% óleo de algodão/2% gordura animal	$A_2 = (0,422 \pm 0,007)A_1 + (0,012 \pm 0,002)$	$r = 0,999$	$A_2 = (0,37 \pm 0,02)A_1 - (0,002 \pm 0,005)$	$r = 0,997$
93% óleo de soja/5% óleo de algodão/2% gordura animal			$A_2 = (0,443 \pm 0,004)A_1 + (0,032 \pm 0,001)$	$r = 0,998$

A1 e A2 correspondem aos valores de absorvância das soluções 1 e 2

Tabela 11. Quantificação de glicerol livre (mg kg^{-1}) em biodiesel pelos métodos SAM, EC, MEC e de referência

Biodiesel* (matéria-prima)	SAM	EC	MEC	Referência (6)
70% óleo de soja/ 30% gordura animal	77 ± 7	95 ± 2	64 ± 2	60
100% óleo de soja	32 ± 3	49 ± 9	29 ± 2	<50
90% óleo de soja/ 10% óleo de algodão	90 ± 0,5	109 ± 15	65 ± 3	60
90% óleo de soja/ 10% gordura animal	74 ± 4	126 ± 9	81 ± 3	75
93% óleo de soja/ 5% óleo de algodão/ 2% gordura animal	135 ± 8	187 ± 8	141 ± 9	150
93% óleo de soja/ 5% óleo de algodão/ 2% gordura animal	159 ± 9	253 ± 31	187 ± 13	200

*Média ± desvio padrão (n = 3)

Tabela 12. Quantificação de índice de iodo ($\text{I}_2/100 \text{ g}$) em biodiesel pelos métodos SAM, EC, MEC e de referência

Biodiesel* (matéria-prima)	SAM	EC	MEC	Referência (12)
70% óleo de soja/ 30% gordura animal	91 ± 9	102 ± 3	106 ± 4	101
100% óleo de soja	120 ± 10	96 ± 11	134 ± 3	132
90% óleo de soja/ 10% óleo de algodão	77 ± 7	101 ± 16	109 ± 11	106
90% óleo de soja/ 10% gordura animal	104 ± 9	135 ± 18	145 ± 1	132
100% óleo de soja	83 ± 9	123 ± 4	105 ± 4	102

*Média ± desvio padrão (n = 3)

Algumas características de procedimentos propostos para quantificação de índice de iodo e de glicerol livre são mostradas na Tabela 13. A quantidade de resíduo gerado pelo procedimento proposto para quantificação de índice de iodo é ca. 10 (12) e 70 vezes (138) menor quando comparada aos procedimentos baseados em eletroforese capilar (139) e titulação (EN 14111) (12). No procedimento para quantificação de glicerol livre, a quantidade de resíduos gerada é ca. 3 vezes menor em comparação ao procedimento espectrofotométrico (6). Além disso, o consumo de amostra é ca. 4 (140), 8 (141) e 20 (6) vezes menor quando comparado aos

procedimentos baseados em eletroforese capilar (140), sistema em fluxo-batelada com detecção piezoelétrica (141) e espectrofotometria UV-Vis (6). As faixas lineares e os LD dos procedimentos propostos atendem aos limites de glicerol livre e índice de iodo permitidos no biodiesel. O CV é ca. 3 vezes menor quando comparado à eletroforese capilar (140) para quantificação de índice de iodo, ca. 2 vezes menor quando comparado ao procedimento espectrofotométrico para a quantificação de glicerol livre (6), e similar ao obtido no procedimento em fluxo (142). O procedimento proposto tem diversas vantagens sobre os procedimentos oficiais baseados em titulação (12) e cromatografia (143), pois requer instrumentação mais simples e evita o uso de solventes tóxicos, como o tetracloreto de carbono (12).

Tabela 13. Características analíticas de procedimentos para a quantificação de índice de iodo e glicerol livre em biodiesel

Procedimento	Amostra (g)	Resíduo (mL)	LD (g I ₂ /100 g)	Resposta linear (g I ₂ /100 g)	CV (%)	Referência
Índice de iodo						
Espectrofotométrico/batelada	1,0	2,2	2,5	10 – 106	3,0	(95)
Eletroforese capilar	0,05	26,2	10,6	5 – 90	6,0	(139)
EN 14111	0,13 – 0,15	> 160	1,0	–	–	(12)
Espectrofotométrico/fluxo	0,2	0,4	4,5	13 – 135	1,7	(142)
Este trabalho	1,0	2,3	5,0	15 – 100	2,3	–
Procedimento	Amostra (g)	Resíduo (mL)	LD (mg kg ⁻¹)	Resposta linear (mg kg ⁻¹)	CV (%)	Referência
Glicerol livre						
Espectrofotométrico	1,00	14,3	2,0	20 – 400	2,0	(6)
Eletroforese capilar	0,20	1,8	0,16	1,5 – 46,5	4,5	(140)
Piezoelétrico/fluxo - batelada	0,40	3,6	0,12	72 – 372	–	(141)
ASTM D6584	0,10	8,0	10,0	50 – 500	–	(143)
Este trabalho	0,05	3,3	10,0	30 – 220	4,3	–

5.4. Conclusões

A estratégia MEC foi pioneiramente aplicada em espectrometria molecular para contornar efeitos de matriz na análise de amostras de biodiesel, gerando resultados exatos para a quantificação de índice de iodo e de glicerol livre em biodiesel produzido a partir de misturas de diferentes matérias-primas (óleos de soja e algodão e gordura animal). Essa estratégia tem grande potencial para ser explorada para monitorar outros parâmetros de qualidade do biodiesel. A estratégia de calibração também reduziu o consumo de reagentes e solventes e tornou o procedimento mais prático e rápido de ser executado, por utilizar somente 2 soluções para a calibração, o que a torna uma alternativa aos procedimentos oficiais para o controle de qualidade de biodiesel.

6. Estratégia de calibração multicanal explorando fotometria por imagens digitais⁵

Resumo

Uma nova estratégia de calibração, análoga ao MEC, é proposta. Ela explora as respostas analíticas em diferentes sistemas de cores obtidos por DIP. A aplicabilidade foi demonstrada pela quantificação de metanol na presença do glicerol, identificado no capítulo 3 como uma espécie potencialmente interferente, pois também é oxidado a formaldeído pelo KMnO_4 em meio ácido. Os sinais analíticos foram baseados nas respostas obtidas em diferentes canais dos sistemas de cores RGB (Vermelho, verde, azul), CMY (Ciano, magenta e amarelo) e HSV (Matiz, saturação e brilho). A estratégia foi primeiramente avaliada com soluções modelo coloridas (vermelho de metila, corante azul brilhante e sulfato de níquel(II)) para estabelecer as condições de contorno para a aplicação da estratégia de calibração. Obteve-se recuperações de 85 a 103% para vermelho de metila, 92 a 104% para azul brilhante e 87 a 113% para vermelho de metila, respectivamente, quando a razão de concentrações de analito na amostra e na solução padrão estava no intervalo 0,2–1,0. Os erros relativos para a quantificação de metanol na presença de glicerol foram de 2–16% usando MEC e 17–48% usando EC. O CV ($n = 10$) e LD (nível de confiança de 99,7%) para MEC foram 3,5% e 7 mg L^{-1} metanol, respectivamente. Resposta linear foi obtida na faixa de 20–500 mg L^{-1} de metanol. A proposta é uma estratégia limpa, simples e prática.

Palavras-chave: Controle de qualidade. Biodiesel. Transesterificação. Método de calibração. *Smartphone*

⁵ SOARES, S.; DONATI, G. L.; ROCHA, F. R. P. Digital-image photometry with multi-energy calibration. *Microchemical Journal*, v. 182, p. 107938, 2022.

Abstract

A novel calibration strategy, analogous to MEC, is proposed. It exploits the analytical responses in different color systems obtained by DIP. The applicability was demonstrated in the quantification of methanol in biodiesel in the presence of glycerol, identified in chapter 3 as a potential interfering species, as it is also oxidized to formaldehyde by acidic permanganate. The analytical responses were based on the color systems RGB (Red, Green, Blue), CMY (Cyan, Magenta and Yellow) and HSV (Hue, Saturation and Brightness). The strategy was first evaluated by using model colored solutions (methyl red, brilliant blue dye, and nickel(II) sulfate) in order to establish boundary working conditions. Recoveries from 85 to 103% (methyl red), 92 to 104% (brilliant blue dye), and 87 to 113% (nickel(II) sulfate) were obtained when the concentration of the analyte in sample/standard was within 0.2 and 1.0. The relative errors for methanol quantification in biodiesel were 2–16%, in comparison to 17–48% achieved by external standard calibration. The CV ($n = 10$) and LD (99.7% confidence level) were 3.5% and 7 mg L⁻¹, respectively. A linear response was observed in the range of 20–500 mg L⁻¹ methanol. The proposal is a simple, practical and environmentally friendly strategy.

Keywords: Quality control. Biodiesel. Transesterification. Calibration method. smartphone

6.1. Introdução

DIP obtidas pela câmera de *smartphones* e os aplicativos de acesso livre têm sido explorados com sucesso para a captura e conversão das imagens em sistemas de cores (53) em diversas aplicações analíticas, tal como aquelas descritas nos capítulos 3, 4 e 8 desta Tese. As medidas analíticas são usualmente baseadas na radiação refletida, e o sistema de cor mais utilizado é o RGB, que utiliza como resposta analítica a cor complementar do produto de medida (106). Outros sistemas de cores também são explorados para fins analíticos, como os sistemas CMY que se refere à composição da cor observada, e HSV que representa a matiz (H) em um ângulo de 360 graus, saturação (S) e brilho (V) da cor. Exemplos de aplicações do sistema de cor CMY são as determinações de cetonas em urina, glicose e nitrito em saliva (144), enquanto o sistema HSV foi aplicado à quantificação de sulfeto em água (145) e de compostos fenólicos em amostra de chá verde, comprimidos de extrato de café verde, soro sintético e urina sintética (146).

Normalmente, a DIP envolve calibração univariada, usualmente pelo método de calibração externa, que geralmente é susceptível a efeitos de matriz. Alguns desses efeitos podem ser contornados por medidas multivariadas, mas essa estratégia é pouco explorada, mesmo com a disponibilidade de ferramentas de tratamento de dados em alguns aplicativos. Por exemplo, o aplicativo Photometrix® possibilita diretamente o uso do método PLSR (106), conforme demonstrado na quantificação de cloreto, hipoclorito, peróxido de hidrogênio e amido em leite (95) e a estimativa do teor de gordura em carnes curadas (94). Medidas multicanal envolvendo regressão multivariada e SVM também foram exploradas para imagens capturadas em diferentes condições de iluminação e até mesmo com imagens obtidas com diferentes câmeras de *smartphones* para a quantificação de clorofilas e carotenóides em óleos vegetais (82). A análise de componentes principais (PCA) tem sido aplicada para classificação de amostras, como demonstrado para o diagnóstico de dengue usando imagens digitais multicanal (147)

Novas estratégias de calibração têm sido propostas para superar efeitos de matriz e agilizar a obtenção de resultados analíticos confiáveis. Nesse contexto, conforme discutido anteriormente (item 1.4 e capítulo 5), destaca-se a estratégia MEC devido à praticidade e eficiência demonstrada em diversas técnicas analíticas. Nesse contexto, foi proposta uma estratégia de calibração, análoga à calibração multi-energia, porém explorando medidas em diferentes canais de cores por DIP,

denominada (MEC-DIP, do inglês *Multi-energy calibration exploring photometry by digital images*). A estratégia foi criticamente avaliada utilizando soluções modelo (vermelho de metila, corante azul brilhante e níquel(II)) para definir condições de contorno para a calibração. Posteriormente, a estratégia foi aplicada para superar a interferência do glicerol na quantificação de metanol em biodiesel. Como discutido no capítulo 3, o glicerol foi identificado como uma espécie interferente, pois também é oxidado a formaldeído pelo KMnO_4 em meio ácido. Essa é uma limitação significativa do procedimento, porque o glicerol é um subproduto da reação de transesterificação, usada para produzir o biodiesel, e sua remoção após a reação pode não ser eficiente.

6.2. Parte experimental

6.2.1. Equipamentos e acessórios

Foram utilizados tubos Eppendorf® de 1,5 mL e um vortex (Nova instruments). As imagens digitais foram adquiridas e convertidas aos valores de RGB com um Iphone (SE) equipado com câmera de 8 megapixels com abertura de lente de f/2.2. As medidas fotométricas foram realizadas sob iluminação controlada, utilizando uma caixa (190 mm de altura × 210 mm de comprimento × 125 mm de largura) coberta internamente com papel branco e com uma lâmpada LED (30 LEDs SMD SLIM, intensidade luminosa de 50 lx) acoplada ao fundo (Figura 5, item 3.2.1.1). Para a aquisição das imagens, a câmera do celular foi posicionada a 5,0 cm do tubo Eppendorf®. Os valores de RGB foram obtidos utilizando o aplicativo PhotoMetrix®1.8 (106) e os valores correspondentes nos sistemas de cores HSV e CMY foram obtidos, a partir dos valores de RGB, utilizando o software colorMine (58).

6.2.2. Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico e água deionizada (resistividade > 18 MΩ cm), em balões volumétricos.

Soluções estoque de corante azul brilhante (Merck) 0,5 g L⁻¹ e vermelho de metila (Synth) 1,0 g L⁻¹ foram preparadas em etanol e a solução de sulfato de níquel(II) (Merck) 300 g L⁻¹ foi preparada em água. Soluções etanólicas de trabalho de corante azul brilhante 1,0–10,0 mg L⁻¹ e vermelho de metila 1,0–10,0 mg L⁻¹ e soluções aquosas de sulfato de níquel(II) 5,0–140,0 g L⁻¹ foram preparadas por diluição dessas soluções estoque.

O reagente de *Schiff* e soluções de KMnO₄ e de ácido oxálico foram preparados conforme descrito no item 3.2.1.2. Soluções padrão de metanol (Merck) 7–200 mg L⁻¹ contendo glicerol 100–400 mg L⁻¹ foram preparadas pela diluição de soluções estoque contendo metanol 35,0 g L⁻¹ e glicerol 4,0 g L⁻¹ em água deionizada.

6.2.3. Procedimento

6.2.3.1. Experimentos com soluções modelo

Soluções de vermelho de metila 1–10 mg L⁻¹, Sulfato de níquel(II) 5–140 g L⁻¹ e azul brilhante 1–10 mg L⁻¹ foram tomadas como amostras e soluções de vermelho de metila ou azul brilhante 7 mg L⁻¹ e de Sulfato de níquel(II) 90 g L⁻¹ como soluções padrão. O procedimento foi realizado adicionando em um tubo Eppendorf® de 1,5 mL, 500 µL da amostra e 500 µL da solução padrão (solução 1) e no segundo Eppendorf® 500 µL da amostra e 500 µL de água (solução 2).

As respostas analíticas foram baseadas nos canais G e B (RGB), M (CMY) e S (HSV) para o vermelho de metila; R e B (RGB), C (CMY) e S (HSV) para sulfato de níquel(II) e R e G (RGB), C (CMY) e S (HSV) para azul brilhante. Os gráficos MEC-DIP foram obtidos a partir da correlação das respostas das soluções 2 versus soluções 1. As concentrações das espécies modelo foram determinadas a partir das inclinações desses gráficos e utilizadas para a estimativa dos valores de recuperação.

As respostas de intensidade de radiação refletida obtidas com um tubo Eppendorf® preenchido com água foram tomadas como referência. Respostas obtidas para as soluções 1 e 2 foram subtraídas dos valores de referência para o sistema RGB e o inverso foi adotado para os sistemas de cores CMY e HSV.

Essas correções garantiram sinais analíticos diretamente proporcionais à intensidade da cor para cada sistema de cores.

6.2.3.2. Quantificação de metanol

Os experimentos foram realizados com soluções de metanol 100 mg L^{-1} contendo ou não glicerol ($0\text{--}400 \text{ mg L}^{-1}$). O procedimento MEC-DIP foi realizado adicionando no primeiro Eppendorf® (solução 1), $300 \mu\text{L}$ de solução de metanol 100 mg L^{-1} (simulando a amostra) e $300 \mu\text{L}$ da solução padrão de metanol 200 mg L^{-1} . No segundo Eppendorf® (solução 2) foi adicionado $300 \mu\text{L}$ da solução metanol 100 mg L^{-1} e $300 \mu\text{L}$ do diluente. A derivação química do analito foi conduzida conforme descrito no capítulo 3. Em ambos os tubos foram adicionados $150 \mu\text{L}$ de solução KMnO_4 190 mmol L^{-1} em H_3PO_4 $1,5 \text{ mol L}^{-1}$. Após 5 min, foi adicionado $120 \mu\text{L}$ de solução de ácido oxálico 400 mmol L^{-1} em H_2SO_4 9 mol L^{-1} , seguido de $500 \mu\text{L}$ do reagente de *Schiff*. Os tubos foram agitados manualmente, após a adição de cada reagente. As medidas analíticas foram realizadas depois de 20 min e os canais R, G e B (RGB) e S (HSV) foram utilizados como respostas analíticas. Os sinais analíticos, os gráficos de MEC-DIP e as concentrações analíticas foram obtidos conforme descrito na seção 6.2.3.1.

Soluções de referência de metanol ($20\text{--}250 \text{ mg L}^{-1}$) foram usadas para calibração externa.

6.3. Resultados e Discussão

Embora respostas analíticas possam ser obtidas em sistemas de cores distintos, a potencialidade multicanal é pouco explorada por DIP (82,94,95,147). O método MEC-DIP foi inicialmente avaliado com soluções modelo de vermelho de metila, corante azul brilhante e sulfato de níquel(II), correspondentes às cores do sistema RGB. Os experimentos objetivaram definir uma estratégia para a seleção dos canais de cor e a avaliação da faixa de concentração do analito na amostra/padrão para alcançar resultados confiáveis (133).

O método MEC explora medidas em comprimentos de onda correspondentes à absorção/emissão do analito, o que é facilmente verificado a partir dos espectros correspondentes. Para DIP, os canais de cor podem ser selecionados considerando as cores complementares (sistema RGB), a própria cor (sistema CMY) ou os valores

de matiz, saturação e brilho (sistema HSV). Os canais de cores que melhor representam cada cor da solução modelo foram avaliados por meio da correlação das respostas analíticas com as concentrações das espécies absorventes.

Para a solução de vermelho de metila (Figura 30) observa-se que todos os canais dos sistemas de cores RGB, CMY e HSV apresentaram respostas lineares com a concentração do analito, exceto o canal H, que é utilizado somente para definir a cor do produto de medida, representada em um ângulo de 360° . Entretanto, optou-se por trabalhar com os canais G e B, M e S, devido à maior resposta em função da concentração do analito e por corresponderem às cores complementares do vermelho (G e B), indicarem a composição (M) e a saturação (S) da cor observada.

Para solução de sulfato de níquel(II) as respostas nos canais G, M e V não variaram em função da concentração do analito, e o canal H, conforme discutido anteriormente, apenas define a cor do produto de medida (Figura 31). Os canais R, B, C e S, que apresentaram as maiores respostas foram selecionados para as medidas analíticas. Estes são os canais adequados para quantificação de níquel(II), pois são cores complementares do verde (R e B), indicam a composição (C) e (S) saturação da cor observada.

Para solução de azul brilhante os canais G, R, C e S mostraram relação linear com a concentração do analito (Figura 32). Esses eram os resultados esperados, considerando que G e R são cores complementares ao azul e C e S indicam a composição e saturação da cor observada.

Figura 30. Variação das respostas em DIP nos sistemas de cores (a) RGB, (b) CMY e (c) HSV em função da concentração de vermelho de metila

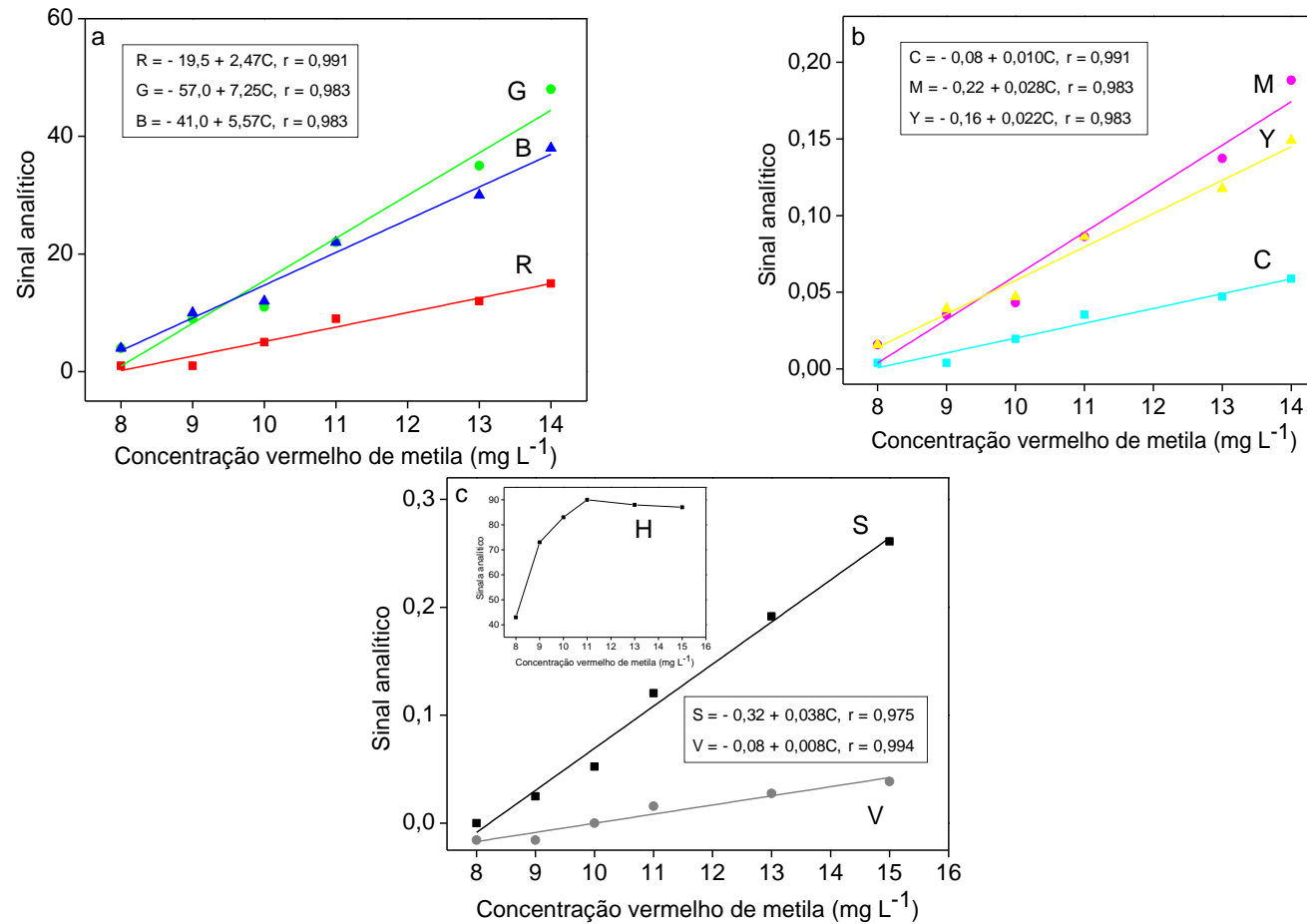


Figura 31. Variação das respostas em DIP nos sistemas de cores (a) RGB (b) CMY (c) HSV em função da concentração da solução de níquel(II).

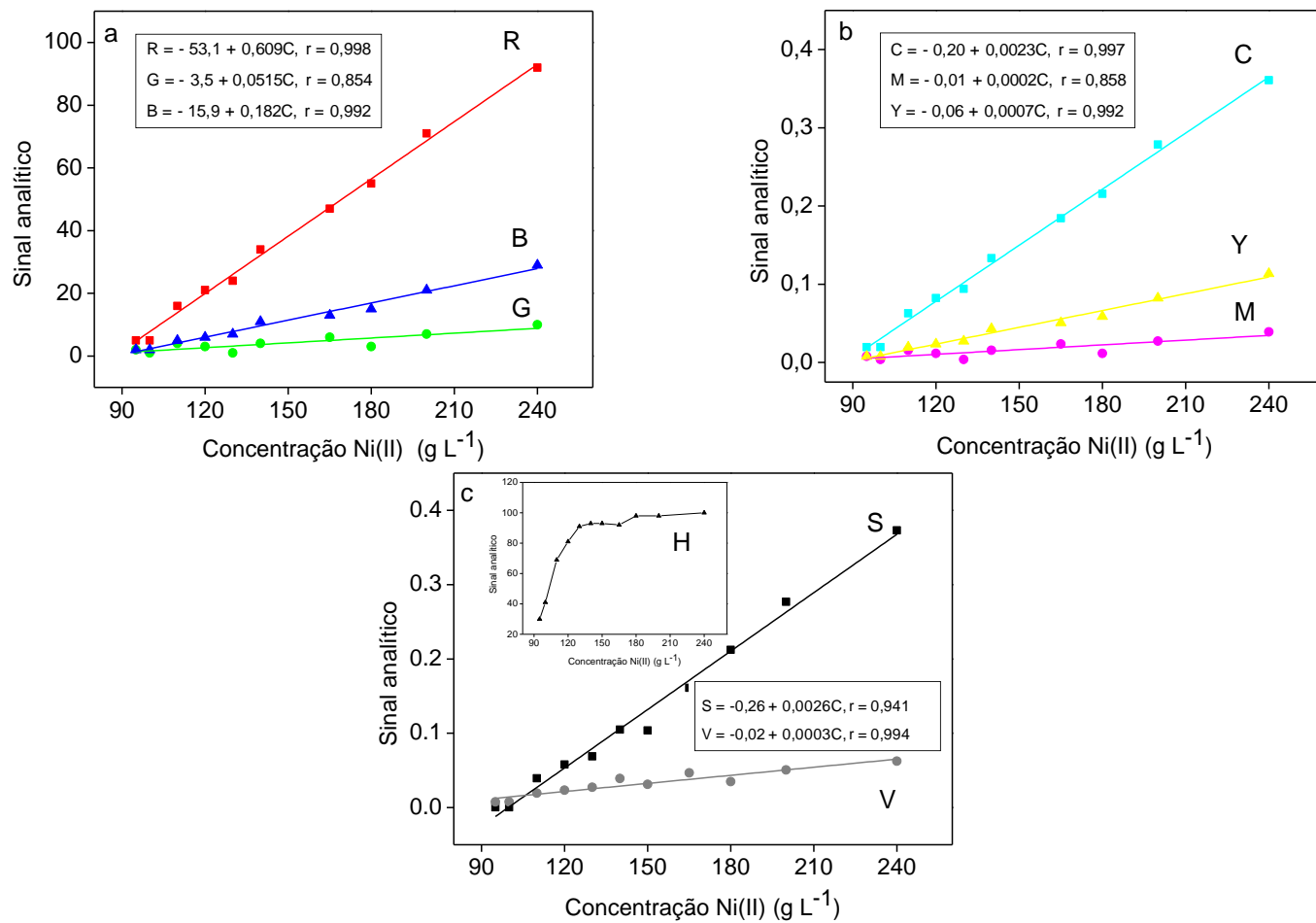
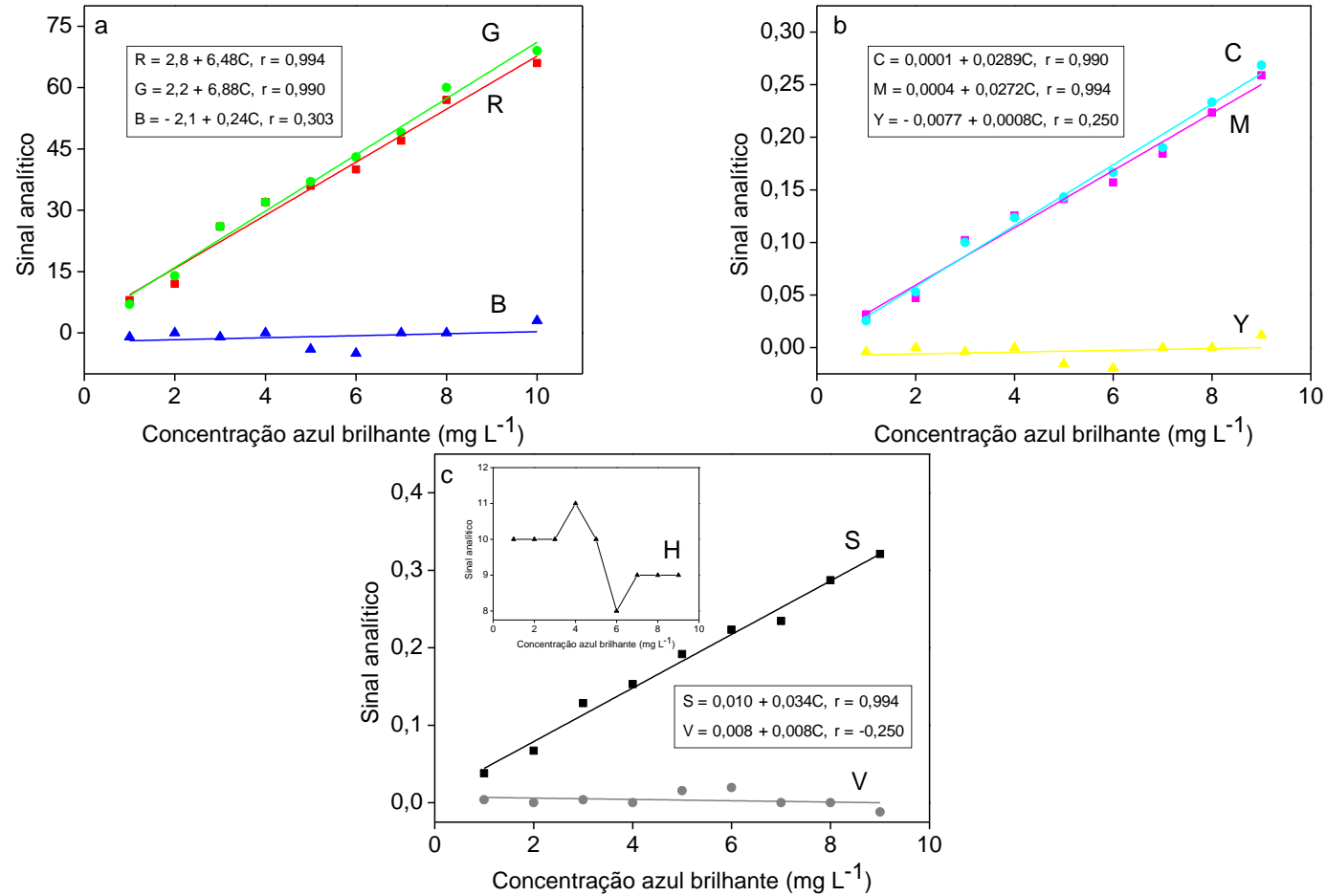


Figura 32 Variação das respostas em DIP nos sistemas de cores (a) RGB, (b) CMY e (c) HSV em função da concentração de azul brilhante



Utilizando os canais de cores previamente estabelecidos, a estratégia MEC-DIP foi aplicada tomando como amostras concentrações variáveis das soluções coloridas e fixando a concentração da solução padrão de vermelho de metila e corante azul brilhante em 7 mg L^{-1} , e de sulfato de níquel(II) em 90 g L^{-1} . Melhores recuperações (85 a 113%) foram obtidas quando a razão de concentração do analito na amostra e no padrão estava entre 0,15–0,22 e 0,85–1,0 (Tabela 14), que correspondem às inclinações das curvas MEC-DIP entre 0,10 e 0,58.

Conforme resultados apresentados na Tabela 15, quando a concentração da amostra foi mantida constante (utilizando solução de sulfato de níquel(II) 40 g L^{-1}) e a concentração do padrão foi variada, foram obtidas recuperações na faixa de 87 a 111% para uma razão de concentração da espécie absorvente no padrão e na amostra no intervalo 0,3–1,0. Esses resultados indicam que melhores recuperações são alcançadas quando a concentração do analito no padrão não excede a concentração do analito na amostra, de acordo com resultados previamente reportados para outras técnicas analíticas (133). Essas condições também foram adotadas no procedimento para quantificar metanol em biodiesel.

Tabela 14. Recuperações estimadas a partir das concentrações determinadas por MEC-DIP. As concentrações das soluções padrão foram fixadas em 7 mg L⁻¹ de vermelho de metila, 90 g L⁻¹ de sulfato de níquel(II) e 7 mg L⁻¹ de azul brilhante

Vermelho de metila (mg L⁻¹)	Recuperação (%)	CA	r
1,0	105	0,131	0,999
2,0	123	0,260	0,998
3,0	94	0,287	0,998
4,0	96	0,355	0,988
5,0	85	0,379	0,991
6,0	103	0,473	0,998
8,0	121	0,583	0,998
10,0	163	0,708	0,998

Níquel(II) (g L⁻¹)	Recuperação (%)	CA	r
5,0	159	0,080	0,992
10,0	79	0,080	0,998
20,0	113	0,216	1
30,0	99	0,249	0,973
40,0	95	0,296	0,998
50,0	110	0,384	0,994
60,0	87	0,367	0,997
75,0	111	0,485	0,999
90,0	108	0,523	0,997
110,0	129	0,612	0,999
140,0	150	0,702	0,999

Azul brilhante (mg L⁻¹)	Recuperação (%)	CA	r
1,0	95	0,119	0,995
2,0	92	0,208	0,997
3,0	120	0,344	0,999
4,0	112	0,399	0,999
5,0	97	0,418	0,999
6,0	103	0,479	0,999
7,0	104	0,518	0,999
8,0	126	0,596	0,999
9,0	132	0,636	0,999

r = coeficiente de correlação linear e CA = coeficiente angular das curvas MEC-DIP.

Tabela 15. Recuperações de sulfato de níquel(II) determinadas pelo procedimento fotométrico explorando MEC-DIP. A concentração de 40 g L⁻¹ foi fixada na amostra e variada na solução padrão

Sulfato de níquel(II) (g L ⁻¹)	Recuperação (%)	CA	r
5,0	29	0,703	0,980
10,0	79	0,764	0,999
20,0	75	0,600	0,992
30,0	108	0,592	0,997
40,0	87	0,464	0,998
50,0	106	0,465	0,998
60,0	88	0,370	0,990
75,0	97	0,340	0,999
90,0	111	0,337	0,997
110,0	118	0,300	0,999
140,0	91	0,207	0,999

r = coeficiente de correlação linear e CA = coeficiente angular das curvas MEC-DIP

A quantificação do metanol foi baseada na oxidação a formaldeído pelo KMnO₄ e posterior reação com o reagente de *Schiff* que resulta em um produto de cor púrpura, tal como explorado no capítulo 3. Nesse procedimento, o glicerol pode ser um interferente, porque também é oxidado a formaldeído, e um excesso do KMnO₄ favorece essa condição.

Quando as concentrações foram determinadas por EC, os erros relativos variaram de 17 a 48% (Tabela 16), evidenciando a interferência do glicerol na quantificação do metanol. Por outro lado, resultados mais exatos foram obtidos usando MEC-DIP (erros relativos de -2 a 16%), mostrando a eficiência da estratégia para contornar a interferência. Isso ocorre porque ambas as soluções de calibração contêm a mesma quantidade de amostra e, portanto, a mesma quantidade da espécie interferente. Pode-se então concluir que a estratégia terá sucesso quando a interferência não depender da razão analito/espécie interferente. Esse é outro aspecto inovador da presente proposta, já que MEC não foi anteriormente explorado para contornar interferências, somente efeitos de matriz.

Nas condições otimizadas, o CV (n = 10) foi estimado em 3,5% e o LD em 7 mg L⁻¹ usando as recomendações da IUPAC com nível de confiança de 99,7% (148).

Tabela 16. Valores médios e incertezas das concentrações de metanol ($n = 3$) determinadas por MEC-DIP e EC em amostras simuladas com diferentes quantidades de glicerol. A concentração de metanol foi fixada em 100 mg L^{-1}

Glicerol adicionado (mg L^{-1})	Metanol* (mg L^{-1})	
	MEC-DIP	EC
100	102 ± 2	120 ± 4
200	98 ± 1	117 ± 4
300	116 ± 12	134 ± 8
400	103 ± 6	148 ± 7

*Média \pm desvio padrão ($n = 3$)

6.4. Conclusões

O método MEC é eficiente para contornar tanto os efeitos de matriz, conforme mostra o capítulo 5, quanto para contornar interferência química causada pelo glicerol na quantificação de metanol. Além da simplicidade e praticidade intrínsecas, necessitando de apenas duas soluções para calibração e quantificação do analito, o procedimento também tem um baixo custo e atende aos requisitos da química verde, devido ao menor consumo de reagentes e geração de resíduos e o tratamento dos dados é simples.

O método MEC tem potencial para expandir a aplicabilidade da DIP para amostras mais complexas, incluindo análises de alimentos e combustíveis. Também demonstra o potencial das medições multicanal para produzir resultados mais exatos, uma estratégia que tende a ser mais usual com a incorporação de ferramentas multivariadas.

7. Procedimento volumétrico verde para quantificar biodiesel em mistura com o diesel ou óleo vegetal⁶

Resumo

Um procedimento volumétrico simples e verde foi proposto para quantificar biodiesel em misturas com o diesel ou óleos vegetais. O método é baseado nas diferenças de solubilidade do biodiesel e diesel (ou óleos vegetais) em meio de etanol/água. As amostras são dissolvidas em etanol anidro e os volumes de uma solução aquo-etanólica necessários para causar a turvação (V_x) são tomados como sinais analíticos e correlacionados diretamente com a quantidade de biodiesel na amostra. Devido à menor solubilidade do diesel ou óleo vegetal em relação ao biodiesel, os valores de V_x são inversamente proporcionais à concentração de biodiesel na mistura. Resposta linear foi obtida entre 7–25 % (v/v) para mistura diesel:biodiesel (400 μ L amostra), enquanto duas faixas lineares, entre 20–50 % (v/v) e 50–80 % (v/v) foram identificadas para misturas de biodiesel:óleo vegetal (250 μ L amostra). Para as misturas biodiesel:diesel, o CV ($n = 10$) e o LD (99,7% de confiança) foram estimados em 6,8% e 2 % (v/v), respectivamente. Os valores correspondentes para a mistura biodiesel:óleo vegetal foram 5,8% e 7 % (v/v), respectivamente. O procedimento requer apenas etanol e água como titulante e gera ca. 10 mL de resíduo por análise. Os resultados concordaram com os obtidos pelo procedimento de referência ao nível de confiança de 95%, demonstrando que o procedimento proposto é uma alternativa para análises de rotina.

Palavras-chave: Adulteração. Óleo vegetal. Transesterificação.

⁶ SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Green volumetric procedure for determining biodiesel content in diesel blends or mixtures with vegetable oils exploiting solubility differences in an ethanol:water medium. **Fuel**, v. 276, p. 118042. 2020

Abstract

A simple and green volumetric procedure was proposed for the quantification of biodiesel in diesel blends or mixtures with vegetable oils. It exploits the differences of solubility of the biodiesel and diesel (or vegetable oils) in an ethanolic-water medium. From samples dissolved in ethanol, the volumes of an aqueous-ethanol solution required to achieve a cloudy suspension are taken as the analytical signals (V_x) and directly correlated to the biodiesel amount in the sample. Due to the lower solubility of diesel or vegetable oils in relation to biodiesel, the V_x values were inversely proportional to the biodiesel amount in the mixtures. A linear response was obtained within 7 and 25%(v/v) for diesel:biodiesel mixture (400 μ L sample), whereas two linear response ranges, 20–50 %(v/v) and 50–80 %(v/v), were obtained for biodiesel:vegetable oil mixture. For biodiesel:diesel blends, the CV ($n = 10$) and LD (99.7% confidence level) were estimated as 6.8% and 2 %(v/v), whereas the corresponding values for the biodiesel:vegetable oil mixture were 5.8% and 7 %(v/v), respectively. The procedure is environmentally friendly as it requires only ethanol and water and generates *ca.* 10 mL of waste per analysis. The results agreed with those obtained by the reference procedure at the 95% confidence level, demonstrating that the proposed procedure is a good alternative for routine analysis.

Keywords: Adulteration. Vegetable oil. Transesterification.

7.1. Introdução

O biodiesel é comercializado misturado ao diesel e, atualmente, a porcentagem adicionada ao diesel deve ser no mínimo 10 %(v/v) (149). Uma notação comum para as misturas é BX, onde X corresponde ao percentual de biodiesel adicionado ao diesel; assim, a mistura de 10 %(v/v) de biodiesel em diesel é representada por B10.

Procedimentos analíticos eficientes para o controle de qualidade do biodiesel e das misturas com diesel são necessários devido à variedade de matérias-primas utilizadas para a produção do biodiesel (7,150). Isso também é relevante para inibir fraudes (8), como a adição de óleos vegetais ao biodiesel comercial, e para garantir que as misturas com diesel contenham a quantidade de biodiesel especificada pela legislação.

O teor de éster é o principal parâmetro de qualidade do biodiesel e a sua quantificação é também necessária para monitorar o rendimento das reações de transesterificação, visando otimizar o tempo de reação, reduzir o consumo de energia e minimizar a hidrólise dos ácidos graxos (7). As normas europeia e brasileira estabelecem a quantidade mínima de 96,5 %(v/v) de ésteres de alquila em biodiesel (8). O procedimento oficial (EN 14103), baseado em GC-FID, é recomendado para quantificar o teor de éster no biodiesel (14), enquanto o procedimento baseado MIR (EN 14078/2009) é indicado para quantificar biodiesel na mistura com o diesel (15). Embora esses procedimentos sejam bem estabelecidos, o procedimento baseado em GC-FID é relativamente caro e demorado (14), enquanto MIR envolve tratamento de dados complexo (15) e a construção de um modelo de calibração multivariado, o que requer uma quantidade adequada de padrões. Procedimentos alternativos baseados em espectrofotometria UV-Vis (151), espectroscopia de fluorescência (152) e cromatografia líquida de alta eficiência (153) têm sido propostos, mas utilizam solventes tóxicos, como heptano (151), hexano (153) e diclorometano (152). Outros procedimentos fotométricos requerem derivação química do analito, em sistema de análises em fluxo (13) ou como *spot test* (43). Classificações quimiométricas de misturas de biodiesel:diesel baseadas em MIR (154) ou utilizando nariz eletrônico (155) também foram descritas. Entretanto, devido à alta demanda analítica, é necessário o desenvolvimento de procedimentos alternativos simples, rápidos, econômicos e que atendam aos requisitos da química verde para o controle de qualidade do biodiesel.

Um método semi-quantitativo explorando diferenças de solubilidade de biodiesel e diesel em uma mistura de metanol, isopropanol, etanol e água, foi desenvolvido para estimar o teor de biodiesel em misturas de diesel (156). O método é baseado na turvação de amostras que contenham biodiesel inferior a 10%, quando misturada aos solventes. O ensaio precisa ser repetido com diferentes proporções de amostra e mistura de solventes para estimar a quantidade de biodiesel (156). No entanto, para atender à legislação, são necessários resultados quantitativos.

Neste contexto, visando quantificar o biodiesel em mistura com o diesel ou com óleos vegetais no processo de produção do biocombustível, esse capítulo da Tese descreve o desenvolvimento de um procedimento volumétrico simples que explora a diferença de solubilidade do biodiesel e diesel (ou óleo vegetal) em uma solução aquo-etanólica. O procedimento proposto é baseado no volume mínimo de uma solução aquo-etanólica necessário para turvar as amostras dissolvidas em etanol anidro, o que indica que o limite de solubilidade do componente mais insolúvel (diesel ou óleo vegetal) foi atingido. O volume necessário para turvar é utilizado como resposta analítica.

7.2. Parte experimental

7.2.1. Equipamentos e acessórios

O procedimento volumétrico foi realizado com uma bureta de 5 mL com subdivisão de 0,01 mL (New Instruments, Brasil, modelo NI 1059) com um tubo de Teflon[®] (2 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro) encaixado na ponta. Um agitador magnético (Quimis, Brasil, modelo 6222T108) foi usado para favorecer a mistura amostra/titulante durante a titulação.

7.2.2. Reagentes e soluções

Soluções aquo-etanólicas contendo 10 ou 15 %(v/v) de água foram preparadas com etanol absoluto (Merck) e água deionizada (resistividade > 18 MΩ cm), em balões volumétricos. Estas soluções foram armazenadas em um ambiente com temperatura entre 25–30 °C.

Foram preparadas misturas de diesel com 10,0 %(v/v) de biodiesel obtido a partir de diferentes matérias-primas: óleo de soja (amostra 1); 90 %(v/v) óleo de soja/10 %(v/v) de óleo de algodão (amostras 2 e 3); 70 %(v/v) óleo de soja/30 %(v/v) de sebo (amostra 4); 90 %(v/v) de óleo de soja/10 %(v/v) de sebo (amostra 5) e 93 %(v/v) de óleo de soja/5 %(v/v) óleo de algodão/2 %(v/v) de sebo (amostra 6).

Amostras também foram preparadas com óleo de soja e biodiesel obtido a partir de diferentes matérias-primas. A amostra A foi preparada com 80 %(v/v) de biodiesel preparado a partir de 70 %(v/v) de óleo de soja/30 %(v/v) de sebo; amostra B foi preparada com 60 %(v/v) de biodiesel preparado a partir de 90 %(v/v) de óleo de soja/10 %(v/v) de sebo; as amostras C e D, foram preparadas com 70 %(v/v) e 50 %(v/v) de biodiesel de soja. As amostras foram diluídas em etanol absoluto 1:6 (v/v) (misturas com diesel) ou 1:20 (v/v) (misturas com óleos vegetais) antes da titulação com as soluções aquo-etanólicas.

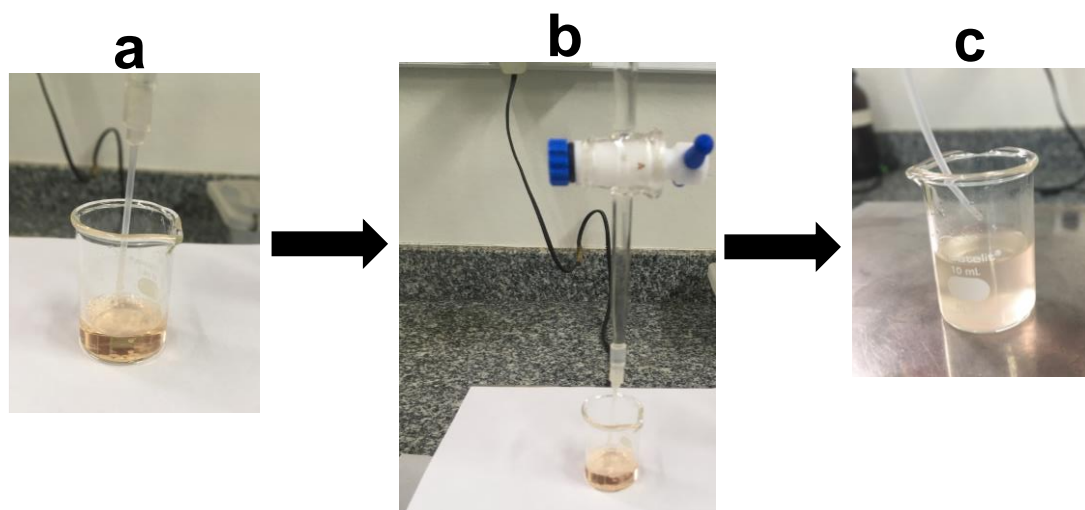
Soluções padrão de biodiesel de 7–25 %(v/v) e de 20–80 %(v/v) foram preparadas usando óleo diesel ou óleo vegetal degomado como diluente.

7.2.3. Procedimento

Imagens ilustrativas das etapas do procedimento são mostradas na Figura 33. Em um béquer de 10 mL, foram adicionados 400 μ L da mistura biodiesel:diesel e 2,5 mL de etanol absoluto ou 250 μ L da mistura biodiesel:óleo vegetal e 5,0 mL de etanol absoluto (Figura 33a). As misturas foram agitadas por 1 min para promover a solubilização da amostra e também durante a titulação, para favorecer a mistura com o titulante (Figura 33b). A solução aquo-etanólica foi adicionada até a primeira evidência de turbidez (Figura 33c). O volume de solução aquo-etanólica consumido para a turvação da amostra (V_x) foi tomado como parâmetro analítico.

A porcentagem de água no titulante foi 10 %(v/v) para as misturas de biodiesel e diesel e 15 %(v/v) para as amostras de biodiesel e óleo vegetal. Todas as medidas, inclusive as relacionadas à otimização do procedimento, foram realizadas em triplicata, visando estimar os desvios padrão. O procedimento foi realizado a temperatura ambiente (25 ± 1) °C.

Figura 33. Etapas do procedimento volumétrico: a) amostra dissolvida em etanol, b) titulação com solução aquo-etanólica sob agitação constante e c) mistura turva indicando que o limite de solubilidade da espécie mais insolúvel foi atingido



7.3. Resultados e Discussão

7.3.1. Aspectos gerais

O procedimento proposto explorou as diferenças de solubilidade das espécies (biodiesel, diesel e óleos vegetais) em água para a quantificação dos componentes nas misturas. O etanol foi selecionado como solvente para dissolver as amostras, por ser miscível com água e com os componentes da mistura. Sendo composto por ésteres de alquila, o biodiesel é mais solúvel do que o diesel (mistura de hidrocarbonetos com 8–16 átomos de carbono) ou óleos vegetais (triglicerídeos) em meio de etanol-água. Isso pode ser exemplificado considerando os coeficientes de partição octanol/água ($\log P$) (157) de compostos modelo: $\log P = 6,82$ para linoleato de metila (158) (composto modelo de éster) e 7,05 para ácido linoleico (159) (principal ácido graxo do óleo de soja). A adição de água à amostra diluída em etanol promoverá então a separação de fase (turvação) quando o limite de solubilidade do componente menos solúvel (diesel ou óleo vegetal) for atingido.

Devido à baixa solubilidade das espécies em água, o procedimento foi realizado com soluções aquo-etanólicas como titulante, visando aumentar a quantidade de titulante necessária para a turvação e, portanto, minimizar os erros nas medidas volumétricas. O volume de solução aquo-etanólica necessário para produzir a primeira evidência de turbidez (V_x) foi tomado como resposta analítica. Considerando esses

aspectos, espera-se que V_x seja inversamente proporcional à quantidade de biodiesel nas amostras.

Diferentemente de uma titulação clássica, na qual a quantificação do analito é realizada por meio da estequiometria da reação, o procedimento proposto requer uma curva de calibração, ou seja, um gráfico de V_x em função da concentração de biodiesel. Assim, não é necessário um titulante padronizado, pois a mesma solução aquo-etanólica será usada para as amostras e soluções padrão.

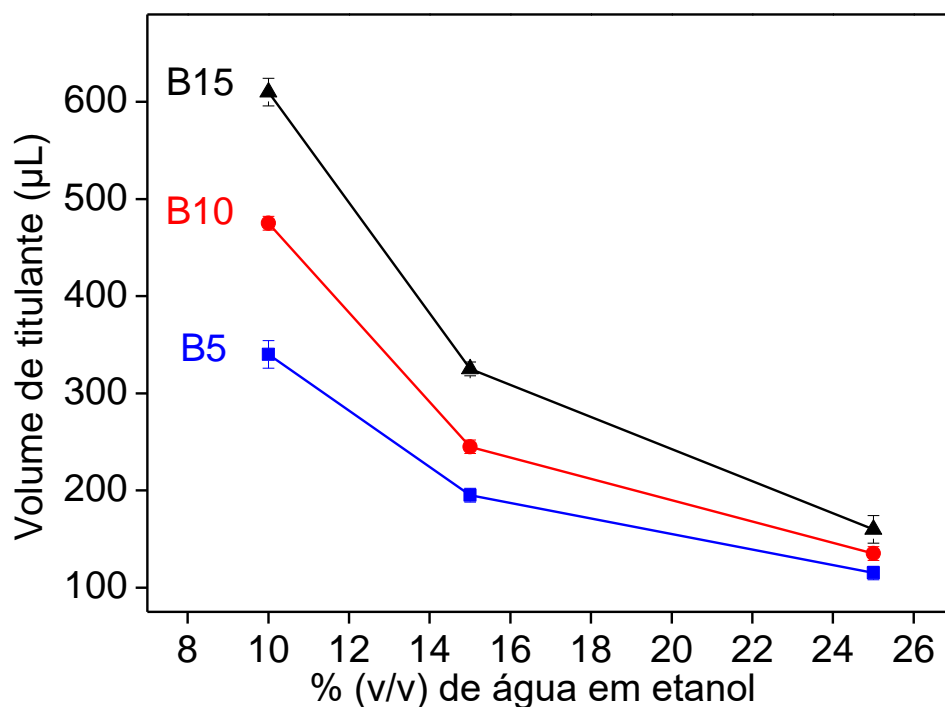
7.3.2. Otimização

7.3.2.1. Quantificação de biodiesel em mistura com o diesel

O teor de água no titulante (solução aquo-etanólica) e os volumes da amostra e do etanol utilizado para diluir a amostra foram otimizados pelo método univariado. As variáveis foram avaliadas com o objetivo de aumentar a diferença nos volumes da solução aquo-etanólica requerida para promover a turbidez de misturas com diferentes concentrações de biodiesel (B5, B10 e B15).

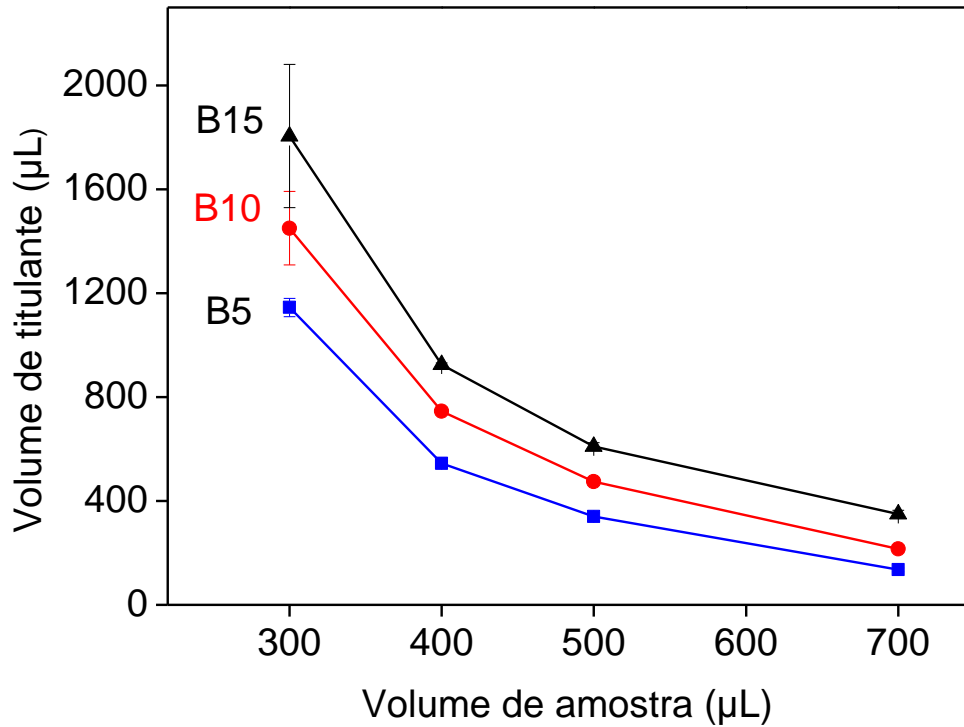
Como mostra a Figura 34, com o aumento da porcentagem de água, os volumes de titulante diminuíram exponencialmente e as diferenças entre as misturas B5, B10 e B15 ficaram menos evidentes. Isso ocorre devido ao limite de solubilidade do diesel em diferentes proporções de água na solução aquo-etanólica. A condição experimental selecionada como ótima foi com 10 % (v/v) de água, pois com concentrações menores não foi possível atingir o limite de solubilidade do diesel mesmo com 10 mL de titulante.

Figura 34. Efeito da porcentagem de água no titulante na resposta analítica. Condições experimentais: 400 μL de amostra solubilizada em 2000 μL de etanol. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



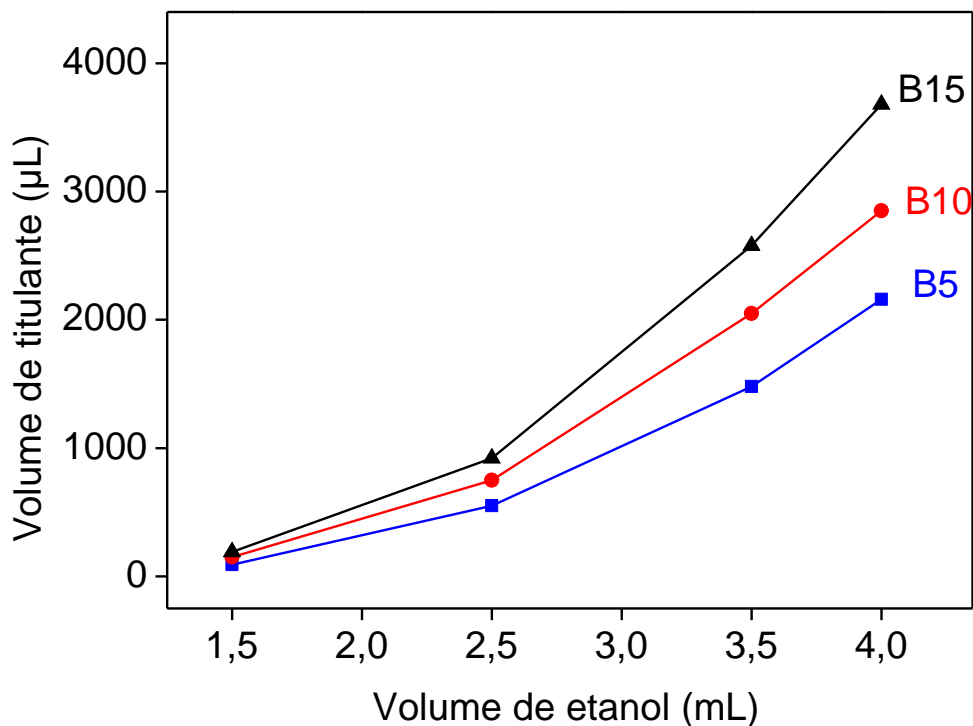
Como mostra a Figura 35, os volumes de solução aquo-etanólica, e, portanto, as diferenças entre as respostas analíticas aumentam com a diminuição do volume de amostra. Isso é esperado devido à menor quantidade de diesel, após a diluição da amostra em etanol. No entanto, para volume de amostra de 300 μL também aumentou a incerteza das medidas e, assim, o volume de amostra de 400 μL foi selecionado como ótimo. Dessa forma, melhora-se a precisão - CV de 15 e 1% foram estimados para volumes de amostra de 300 e 400 μL , respectivamente.

Figura 35. Efeito do volume de amostra na resposta analítica. Condições experimentais: 2000 μL de etanol e titulante com 10 % (v/v) de água. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$).



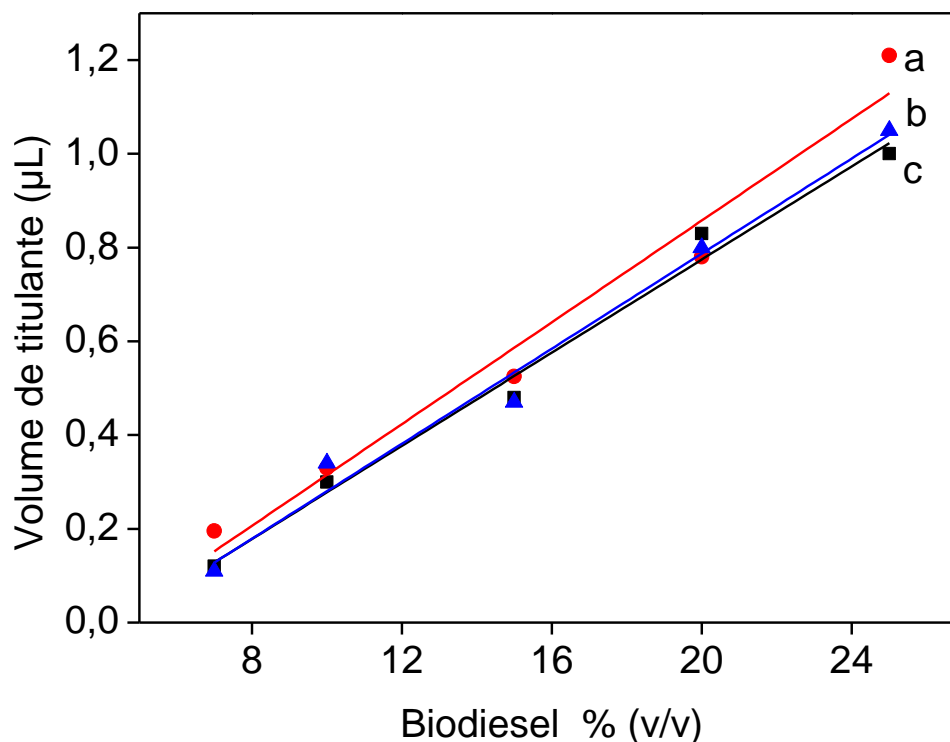
O etanol foi usado para diluir a amostra e aumentar a solubilidade da mistura com o titulante. As respostas analíticas aumentaram exponencialmente com o volume do diluente (Figura 36). No entanto, a diluição de 400 μL de amostra com 4,0 mL de etanol obteve uma faixa linear até 15 % (v/v) de biodiesel (Figura 36), o que dificultaria a aplicação em amostras comerciais com quantidades maiores de biodiesel. Portanto, foi selecionado 2,5 mL de etanol anidro como o volume ótimo para a diluição da amostra, o que resultou em uma resposta linear até 25,0 % (v/v) de biodiesel, adequada à aplicação proposta.

Figura 36. Efeito do volume de etanol para a solubilização da amostra na resposta analítica. Condições experimentais: 400 μL de amostra e titulante com 10 % (v/v) de água. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$).



O efeito da temperatura na solubilidade das espécies envolvidas (amostra diluída em etanol) foi avaliado (Figura 37). As respostas analíticas foram avaliadas próximas à temperatura ambiente e as variações nas inclinações das curvas analíticas (0,054 a 28 °C, 0,051 a 25 °C e 0,050 a 23 °C) não foram significativas (inferiores a 8%). Dessa forma, os próximos experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25 ± 2) °C.

Figura 37. Efeito da temperatura nas inclinações das curvas analíticas: (a) 28, (b) 25 e (c) 20 °C. Condições experimentais: 400 μL de amostra, 2500 μL de etanol e titulante com 10 % (v/v) de água



7.3.2.2. Quantificação de biodiesel em mistura com óleos vegetais

Devido à menor solubilidade dos óleos vegetais no etanol em comparação ao diesel, algumas alterações nas condições otimizadas para quantificar biodiesel misturado ao diesel foram necessárias para que fosse possível quantificar biodiesel em mistura com óleo vegetal. O volume de etanol para definido como ótimo foi 5,0 mL, o que foi suficiente para dissolver até 250 μL de óleo vegetal. Considerando essas condições (250 μL de óleo vegetal, 5 mL de etanol e o titulante com 10 % (v/v) de água, resposta linear foi obtida até 50 % (v/v) de biodiesel. No entanto, o limite máximo da faixa linear está abaixo do limite mínimo de 96,5%, estabelecido pelas normas brasileira (07/2008) e europeia (EN14214) (8). Diante disso, para expandir a faixa linear foi necessário aumentar a quantidade de água no titulante para 15 % (v/v), e foi estimada uma faixa linear de 50–80 % (v/v) de biodiesel. Amostras com porcentagens de biodiesel acima de 80 % (v/v) devem ser diluídas em etanol para que se enquadrem à faixa linear do procedimento.

7.3.3. Características analíticas

Nas condições otimizadas, obteve-se resposta linear para mistura diesel:biodiesel entre 7–25 %(v/v), descrita pela equação $V = -0,202 + 0,055C$, $r = 0,993$. Para mistura biodiesel:óleo vegetal, utilizando e titulante com 10,0 %(v/v) de água, foi obtida resposta linear entre 20–50 %(v/v), descrita pela equação $V = 0,114 + 0,050C$, $r = 0,996$. Com 15,0 %(v/v) de água na solução titulante, foi obtida resposta linear entre de 50–80 %(v/v), de acordo com a equação $V = -2,5 + 0,076 C$, $r = 0,994$. O CV foi estimado em 6,8% ($n = 10$) e os LDs (99,7% de confiança) em 2 %(v/v) (biodiesel:diesel) e 7 %(v/v) (biodiesel:óleo vegetal). O procedimento requer apenas etanol e água como titulante e gera ca. 10 mL de resíduo por análise, atendendo aos requisitos da química verde (9).

Para a avaliação da exatidão, amostras foram analisadas pelo procedimento proposto e de referência baseado em DIP (43), e os resultados (Tabelas 17 e 18) foram comparados utilizando o teste t pareado. Os valores obtidos (0,23 para biodiesel:diesel e 0,19 para biodiesel:óleo vegetal) foram menores que os valores críticos (2,44 e 2,77), respectivamente, indicando que os resultados são concordantes ao nível de confiança de 95%. As variâncias foram comparadas pelo teste F e os valores calculados também foram concordantes com 95% de confiança.

Tabela 17. Biodiesel determinados em misturas com diesel pelos procedimentos proposto e referência

Biodiesel (matéria-prima)	Biodiesel %(v/v)*		Valor F^{**}
	Proposto	Referência (43)	
100% soja	9,5 ± 0,5	10,3 ± 0,3	2,8
90% soja / 10% algodão	9,3 ± 0,3	8,5 ± 0,3	1,0
90% soja / 10% algodão	10 ± 1	10 ± 1	1,0
70% soja / 30% sebo	8,7 ± 0,5	9,4 ± 0,3	2,7
90% soja / 10% sebo	9,8 ± 0,9	9,4 ± 0,3	2,7
93% soja / 5% algodão / 2% sebo	9,2 ± 0,6	10,3 ± 0,3	1,2

**F crítico = 19,0 (95% nível de confiança)

*Média ± desvio padrão ($n = 3$)

Tabela 18. Biodiesel determinados em misturas com óleo vegetal pelos procedimentos proposto e referência

Biodiesel (matéria-prima)	Biodiesel %(v/v)*		Valor F**
	Proposto	Referência (43)	
70% soja / 30% sebo	83 ± 3	88 ± 1	9,0
90% soja / 10% sebo	56 ± 1	63 ± 1	1,0
100% soja	69 ± 1	75 ± 1	1,0
100% soja	53 ± 2	50 ± 1	4,0

**F crítico = 19,0 (95% nível de confiança)

*Média ± desvio padrão (n = 3)

Algumas características analíticas do procedimento proposto e daqueles reportados na literatura são mostradas na Tabela 19. O procedimento envolvendo análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica (FIA-SP, do inglês *Flow analysis with spectrophotometric detection*) (13), GC-FID (160) ou cromatografia gasosa com espectrometria de massas com detector de ionização por impacto de elétrons (GC-EI-MS, do inglês *Gas chromatography electron impact mass spectrometry*) (161) usam ésteres metílicos de ácido graxo como padrões (160,161) para a construção da curva de calibração, que são relativamente de alto custo. O procedimento baseado em Fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF, do inglês *Energy dispersive X-ray fluorescence*) (162) e o procedimento proposto empregam biodiesel diluído em diesel para preparar as soluções padrão. Além disso, o procedimento baseado em cromatografia gasosa com espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons, (GC-EI-MS, do inglês *Gas chromatography electron impact mass spectrometry*) (161) utiliza hexano no preparo de amostra. O procedimento proposto e o que explora análises em fluxo (13) utilizam etanol, que é ambientalmente amigável e mais acessível. O procedimento proposto para quantificar biodiesel misturado ao diesel possui um LQ maior do que os procedimentos citados na Tabela 19, porém atende ao porcentual de biodiesel que deve ser adicionado ao diesel atualmente, *i.e.* 10 %(v/v) (149). O CV do procedimento proposto é menor que o procedimento baseado em GC-EI-MS (161) e similar ao procedimento baseado em GC-FID (160).

Tabela 19. Características analíticas dos procedimentos para a quantificação do teor de éster em biodiesel e biodiesel em misturas com o diesel

Procedimento	Solvente para preparo da amostra	LD (%)	CV (%)	Preparo da curva de calibração	Referência
Biodiesel:diesel					
EDXRF	—	0,5	0,2	Misturas de biodiesel:diesel	(162)
Espectrofotometria-UV-Vis	heptano	0,5	4,0	Misturas de biodiesel:diesel	(151)
FIA-SP	etanol	0,2	0,03	Linoleato de metila	(13)
Este trabalho	etanol	7,0	6,8	Misturas de biodiesel:diesel	—
Biodiesel (Teor de ésteres)					
GC-FID	—	$2,3 \times 10^{-5}$	6,7	Padrões de éster metílico de ácidos graxos	(160)
GC-EI-MS	hexano	$7,8 \times 10^{-5}$	8,0	Padrões de éster metílico de ácidos graxos	(161)
FIA-SP	etanol	0,8	0,4	Linoleato de metila	(13)
Este trabalho	etanol	2,0	5,8	Misturas de biodiesel:diesel	—

7.4. Conclusões

O procedimento volumétrico desenvolvido utiliza somente etanol e água para a quantificação de biodiesel misturado ao diesel ou óleo vegetal e gera baixas quantidades de resíduos. Também requer equipamentos simples e acessíveis, é um procedimento fácil de ser executado e econômico, o que é atraente para análises de rotina, incluindo determinações diretamente nos postos de combustíveis ou durante o transporte do combustível. O biodiesel pode ser utilizado para preparar soluções padrão para a calibração. O procedimento proposto é alternativo ao oficial para a quantificação da quantidade de biodiesel em diesel e detectar adulterações por óleos vegetais e pode ser aplicado para monitorar o rendimento da reação de transesterificação em usinas de produção de biodiesel, minimizando tanto o consumo de energia quanto a degradação dos ácidos graxos.

8. Dispositivo microfluídico para a quantificação de biodiesel em mistura com o diesel⁷

Resumo

A quantificação de biodiesel em mistura com o diesel é necessária para evitar fraudes, como a adição de óleos vegetais ao biodiesel, e para garantir que as misturas contenham a quantidade de biodiesel especificada pela legislação. Dessa forma, é essencial desenvolver procedimentos para o controle de qualidade que permitem análises mais práticas, rápidas e de baixo custo. Neste capítulo da Tese, discute-se o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico explorando DIP obtidas com *smartphone* para a quantificação de biodiesel em mistura com o diesel. O procedimento foi baseado na reação dos ésteres de alquila com NH_2OH em meio básico, gerando o íon hidroxamato correspondente que, em meio ácido, forma um complexo violeta com Fe(III) . A resposta analítica foi baseada na intensidade de radiação refletida, medida como valores de RGB. O sinal analítico foi medido no canal G, considerando a complementaridade com a cor do complexo formado. Resposta linear foi obtida no intervalo 5–30 % (v/v) de linoleato de metila, descrita pela equação: $G = 69,6 + 2,1C$ ($r = 0,999$). O CV ($n = 10$) e o LD (99,7% de confiança) foram estimados em 4,0% e 0,04 % (v/v), respectivamente. O procedimento consome apenas 60 μL da mistura biodiesel:diesel, diluída 1:50 (v/v) em etanol, 233 μg de NH_2OH , 480 μg de NaOH , 14 μg de Fe(III) e equivalente a 1,2 μL de HNO_3 69 % (v/v) por análise. As porcentagens de biodiesel determinadas em amostras comerciais foram concordantes com os valores obtidos pelo procedimento de referência MIR ao nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: Teor de éster. Adulteração. Óleo vegetal.

⁷Soares, Samara; Ramos-Lorente, Celia E.; Ruiz-García, Isidoro; Rocha, Fábio R. P.; Erenas, Miguel M.; Orbe-Payá, Ignacio de; López-Ruiz, Nuria; Capitán-Vallvey, Luis F. A cost-effective microfluidic device for smartphone-based photometric biodiesel content in diesel blend. **Sensors and Actuators B Chemical**, v. 390, art. 134033, 2023.

Abstract

Quantification of the biodiesel content in diesel blends is needed to inhibit fraud, such as addition of vegetable oils to biodiesel, and to ensure that the blends contain the amount of biodiesel specified by legislation. Thus, it is essential to develop procedures for quality control aiming at more practical, fast, and cost-effective analyses. In this Thesis chapter, a microfluidic device exploiting smartphone-based DIP was developed for the quantification of biodiesel in diesel blends. The procedure involves the reaction of the alkyl esters with hydroxylamine in alkaline medium to form the corresponding hydroxamate ion, with further formation of a violet complex with Fe(III) in acidic medium. The analytical responses were based on the intensity of the reflected radiation measured as RGB values, taken the G channel for the analytical measurements, considering the complementarity with the reaction product color. A linear response was obtained from 5 to 30 %(v/v) methyl linoleate, described by the equation: $G = 69.6 + 2.1C$ ($r = 0.999$), with CV ($n = 10$) of 4.0% and LD (99.7% confidence) of 0.04 %(v/v). The procedure consumes as low as 60 μL of the biodiesel:diesel mixture, diluted 1:50 (v/v) in ethanol, 233 μg of hydroxylamine, 480 μg NaOH, 14 μg Fe(III), and an amount equivalent to 1.2 μL of 69 %(v/v) HNO_3 . The biodiesel concentrations determined in commercial samples by the proposed procedure and by Mid-infrared spectroscopy reference procedure agreed at the 95% confidence level.

Keywords: Ester content. Adulteration. Vegetable oil.

8.1 Introdução

Apesar de amplamente utilizado devido à relevância ambiental e sustentabilidade, em alguns países, o custo de produção do biodiesel é superior ao do diesel (7). Diante disso, é imprescindível o monitoramento da quantidade de biodiesel adicionada ao diesel, com o intuito de inibir fraudes, como discutido no capítulo 7 desta Tese. O procedimento analítico oficial para quantificar biodiesel em blends com diesel é baseado em MIR (15). Procedimentos baseados em espectroscopia no infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near infrared*) também foram desenvolvidos para quantificar biodiesel e detectar adulteração com óleos vegetais em misturas diesel:biodiesel (16,163,164). Equipamentos MIR portáteis estão disponíveis para análises em campo (165), porém o processamento dos dados é demorado e requer a construção de modelos de calibração adequados a partir de padrões, nem sempre disponíveis. Procedimentos alternativos para quantificar o teor de biodiesel têm sido propostos, mas normalmente envolvem várias etapas analíticas e requerem quantidades significativas de solventes tóxicos, por exemplo, os baseados em espectrofotometria UV-Vis, que utilizam 10 mL de heptano (151) ou 5 mL de hexano (166) por análise. Consequentemente, os procedimentos geram volumes significativos de resíduos, por exemplo, 102 mL (166) ou 17 mL (151) por análise. Para contornar esses inconvenientes e contemplar os princípios da química verde, foram propostos procedimentos espectrométrico em fluxo (13) ou explorando DIP (43). No entanto, esses procedimentos não são atrativos para análises diretamente em postos de combustível, devido à falta de portabilidade (13) ou às várias etapas envolvidas (43).

Dispositivos microfluídicos têm sido utilizados com sucesso para análises *in situ*, viabilizando a obtenção rápida de resultados analíticos com mínimo consumo de reagentes e solventes (167,168). Essa estratégia também têm sido associada com sucesso à DIP, com uma diversidade de aplicações (169), como a quantificação de glicose no sangue (170,171) e de Cu(II) em cachaça (172). Apesar do alto potencial de aplicação em análises de biodiesel e de misturas biodiesel:diesel, dispositivos microfluídicos ainda não foram explorados para este fim, o que motivou o desenvolvimento dessa meta da Tese. O trabalho foi desenvolvido durante o estágio de pesquisa realizado na Universidade de Granada/Espanha.

8.2 Parte experimental

8.2.1 Equipamentos e acessórios

Uma impressora a laser (Rayjet) foi utilizada para cortar os materiais mylar, vinil e metacrilato com espessuras de 0,4, 2,5 e 4,5 mm e os papéis em formato circular. Um vortex (Boeco Germany, model BOE 8062000) e um banho ultrassom (Selecta, model 113834) foram utilizados para favorecer a dissolução de reagentes no preparo das soluções.

Suportes para a reação com 4 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foram obtidos de absorventes íntimo (Evax Liberty/ Super Alas) e cortados usando um perfurador (KNIPEX 90 70 220). O polímero poli(N-isopropil acrilamida) (pNIPAN), com espessuras de 0,75, 1,0 e 1,5 mm, foi preparado usando módulos para o sistema de eletroforese Mini-PROTEAN Tetra da BIO-RAD, composto por suporte Tetracell & Clamps (modelo 1658050), placas de vidro (modelos 1653312 e 1653308) e vedações (modelo 1653305).

Uma caixa comercial portátil para fotografia (24 cm de altura x 23 cm de comprimento x 22 cm de largura) com 20 LEDs brancos (PULUZ) posicionados na parte superior, foi usada para obter as imagens digitais em condições de iluminação controlada. Foi utilizado um Iphone (SE) equipado com câmera de 8 megapixels com abertura de lente de f/2.2 para a aquisição das imagens e o software ImageJ[®] para obter os valores de RGB, com uma região de interesse de 60x130 pixels.

8.2.2 Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico e água deionizada (resistividade > 18 MΩ cm), em balões volumétricos.

Solução de NH_2OH 0,30 mol L^{-1} foi preparada dissolvendo 1,15 g de $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ (Panreac) em 5 mL de água e completado para 50 mL com etanol anidro (Merck). Solução de NaOH 0,30 mol L^{-1} foi preparada dissolvendo 0,60 g do reagente (Panreac) em 5 mL de água e avolumado com etanol para 50 mL. A solução de Fe(III) 10 mmol L^{-1} foi preparada pela dissolução de 0,240 g de $\text{NH}_4\text{Fe(SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Panreac) em 20 mL de solução de 1,60 mol L^{-1} HNO_3 (Panreac), completando o volume para 50 mL com água, obtendo-se uma concentração final de HNO_3 0,65 mol L^{-1} .

Diesel S10 contendo (até 10 ppm de enxofre) ou S500 contendo (até 500 ppm de enxofre) foram obtidos de refinarias da Petrobras. As misturas de biodiesel com diesel foram preparadas a partir do biocombustível obtido de diferentes matérias-primas: 70 %(v/v) de óleo de soja e 30 %(v/v) sebo (amostras 1, 3 e 8); 90 %(v/v) de óleo de soja e 10 %(v/v) de sebo (amostras 2 e 5); 90 %(v/v) de óleo de soja e 10 %(v/v) de óleo de algodão (amostra 4); 100 %(v/v) de óleo de soja (amostras 6 e 7) e 93 %(v/v) de óleo de soja, 5 %(v/v) de óleo de algodão e 2 %(v/v) de sebo (amostra 9). Essas amostras de biodiesel foram obtidas diretamente de usinas produtoras.

Soluções padrão linoleato de metila de 0,1–0,6 %(v/v) foram preparadas por diluição de um padrão 99 %(v/v) (Sigma) em etanol anidro. As amostras de biodiesel foram diluídas 1:50 v/v em etanol anidro.

O pNIPAM foi preparado pela dissolução de 640 mg de N-Isopropilacrilamida (Aldrich), 80 mg de Dextran Leuconostoc ssp 70 (Fluka) e 16 mg de N,N-Metilenobis(acrilamida) (Sigma Aldrich) em 4 mL de água deionizada, seguido da adição de 200 μL de solução de persulfato de potássio 65 mmol L^{-1} e 48 μL de N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina. Posteriormente, a mistura foi colocada em um molde de polimerização a 30 °C por 1 h e o polímero foi armazenado em um recipiente com água em temperatura ambiente.

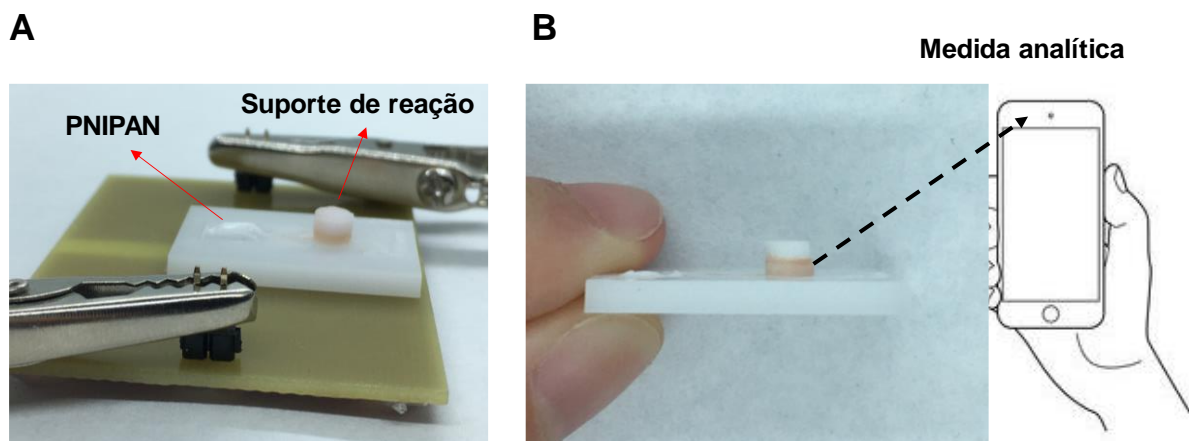
Para a absorção da solução de Fe(III) pelo pNIPAM, o polímero foi cortado em diferentes tamanhos (2 x 2 mm, 2 x 3 mm, 3 x 3 mm, 3 x 4 mm, 4 x 4 mm e 4 x 5 mm), os pedaços foram secos em uma chapa aquecedora a 50 °C e, então, imersos na solução de Fe(III) em HNO_3 por 1 h.

8.2.3 Procedimento

O procedimento analítico foi realizado adicionando 60 μL das amostras, diluídas 1:50 v/v em etanol anidro, ou solução padrão (0,1–0,6 %(v/v)) no suporte de reação (Figura 38A), juntamente com 10 μL de solução de NH_2OH 0,20 mol L^{-1} e 40 μL de solução de NaOH 0,30 mol L^{-1} . Após 20 min de reação, a solução de Fe(III) foi liberada do pNIPAN por aquecimento a 42 °C, para formar o complexo Fe(III)/hidroxamato. As medidas fotométricas foram realizadas diretamente na lateral do suporte de reação (Figura 38B) sob iluminação controlada. O celular foi

posicionado na parte superior da caixa, ca. 10,0 cm de altura, para as medidas analíticas.

Figura 38. Fotografias do dispositivo microfluídico (A) e da área de interesse para as medidas fotométricas (B) para a quantificação de biodiesel em misturas com o diesel

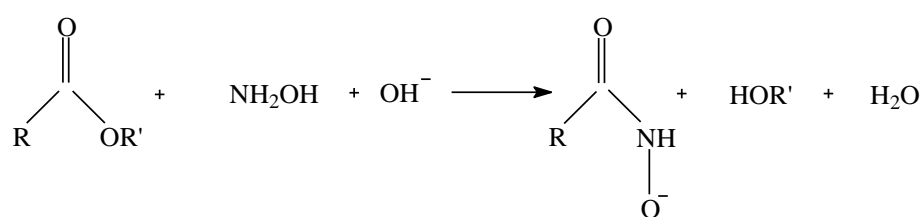


Os sinais analíticos foram obtidos subtraindo os valores do canal G (medidos como intensidades da radiação refletida) do valor correspondente à reflexão total de radiação (255), obtendo-se assim valores proporcionais às concentrações de linoleato de metila.

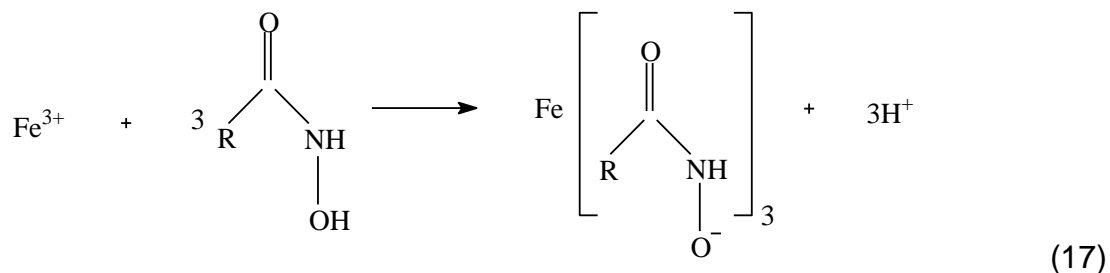
8.3. Resultados e Discussão

8.3.1. Aspectos gerais

O método analítico para a quantificação de biodiesel em mistura com o diesel foi baseado na reação dos ésteres de alquila com a NH_2OH , em meio alcalino, gerando os íons hidroxamato correspondentes (Eq. 16) que, em meio ácido, reagem com o Fe(III), formando o complexo Fe(III)/hidroxamato (Eq. 17).



(16)



Devido às características hidrofóbicas do biodiesel e do diesel, e às propriedades hidrofílicas dos reagentes, esses foram preparados em meio etanólico contendo o mínimo de água, e as amostras também foram diluídas em etanol.

Os primeiros experimentos foram realizados em papel filtro e fio de algodão como suportes, visando avaliar a formação do complexo de medida na superfície destes materiais, porém os resultados não foram reprodutíveis. A baixa reprodutibilidade foi devida à distribuição não uniforme do produto de medida nos materiais, o que tem relação com a rápida evaporação do etanol utilizado para preparar os reagentes e diluir a amostra. Papel de acetato de celulose, fibra de vidro e tecido (sarja de algodão, flanela e 100% poliéster), papel com membrana hidrofílica (quitosana) (173) e o material obtido de absorventes também foram avaliados como suporte. Entretanto, somente no material proveniente de absorvente foi observado a formação do complexo Fe(III)/hidroxamato, qual foi definido como suporte de reação.

O íon hidroxamato pode formar complexos com outros íons metálicos, além do Fe(III) (43). Então, foram avaliadas reações com soluções de V(V) e Cu(II) preparadas em meio de HCl e HNO₃. Nas mesmas condições experimentais utilizadas para a reação com Fe(III) (50 µL de linoleato de metila 0,6 % (v/v), 30 µL de NaOH 0,30 mol L⁻¹, 15 min de reação e 20 µL de solução de V(V) ou Cu(II) 8,0 mmol L⁻¹ preparada em HNO₃ ou HCl 0,65 mol L⁻¹), a reação ocorreu apenas com V(V) em HNO₃, gerando um complexo de cor púrpura, que não foi estável. Dessa forma, os próximos experimentos foram realizados com Fe(III) em HNO₃.

O procedimento proposto requer a construção de um dispositivo microfluídico com canais para fluir volumes de soluções na ordem de microlitros visando reações sequenciais que requerem diferentes meios reacionais, *i.e.* formação do hidroxamato em meio básico e do complexo com o Fe(III) em meio ácido. Diante disso, diferentes

materiais (mylar, vinil e metacrilato) foram avaliados para a construção do dispositivo. Observou-se absorção das soluções pelo metacrilato, enquanto no mylar, devido à espessura do material, os canais construídos para escoar as soluções não foram profundos, o que prejudicou a interação dos reagentes com o analito e a formação do produto. Melhor interação analito/reagente foi observada em vinil, que foi definido para construção do dispositivo.

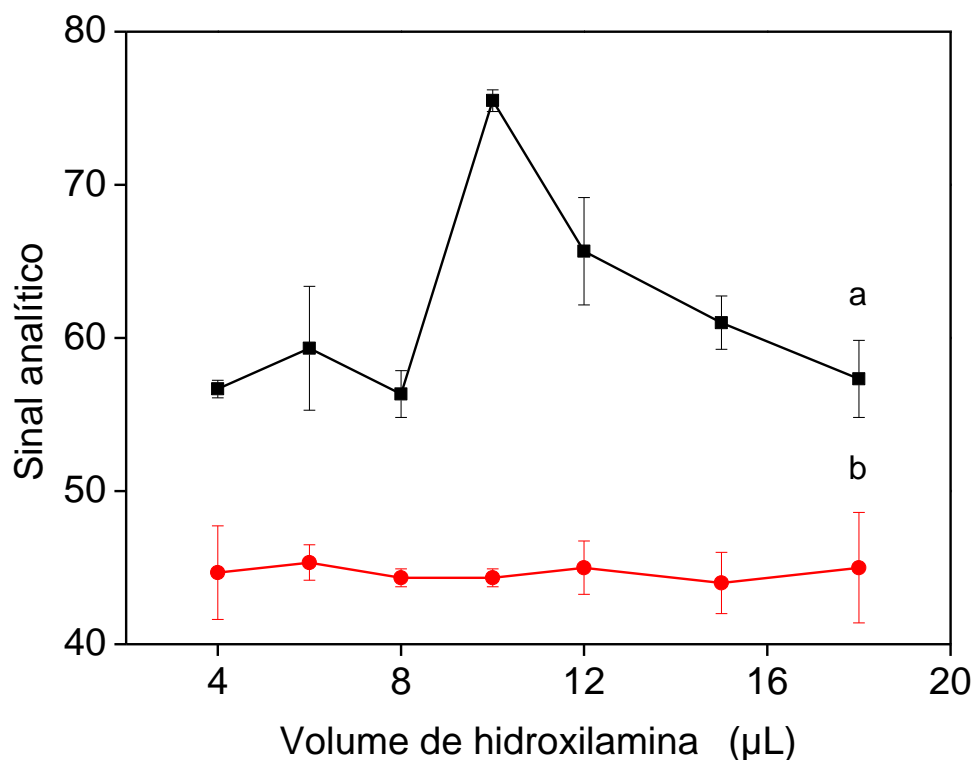
8.3.2 Otimização

O linoleato de metila (principal éster produzido pela transesterificação do óleo de soja com metanol) foi selecionado como espécie modelo para as otimizações e calibração, devido à predominância do óleo de soja como matéria-prima para a produção de biodiesel no Brasil (43).

O procedimento para a formação do complexo Fe(III)/hidroxamato foi otimizado pelo método univariado, com o objetivo de maximizar a resposta analítica e reduzir o consumo de reagentes. Com base em experimentos preliminares, foram fixadas as concentrações de NH_2OH ($0,30 \text{ mol L}^{-1}$), NaOH ($0,30 \text{ mol L}^{-1}$) e Fe(III) ($8,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em HNO_3 $0,65 \text{ mol L}^{-1}$), e otimizados os volumes das soluções (amostra e reagentes) e os tempos de reação. Os experimentos foram realizados no suporte de reação de material absorvente, descrito no item 8.3.1. e, posteriormente, foi avaliado o pNIPAN como um recipiente das soluções de NH_2OH e Fe(III) e avaliadas as dimensões do dispositivo microfluídico.

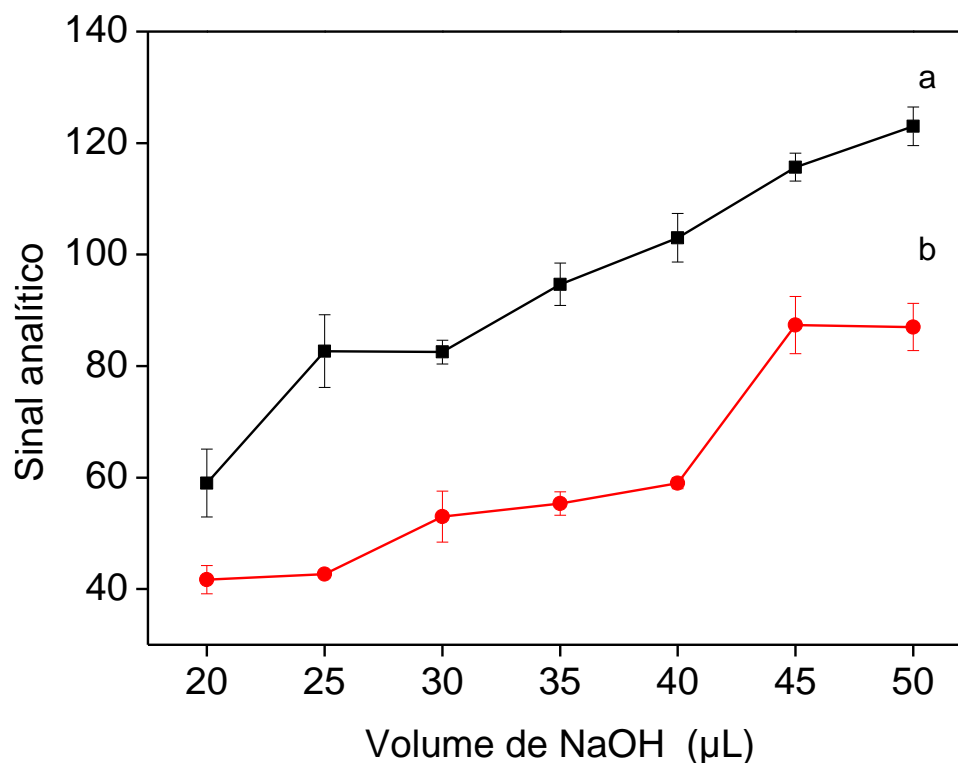
A primeira etapa do processo de derivação química dos ésteres de alquila envolve a formação do íon hidroxamato em meio alcalino (Eq. 16). Com relação ao volume de NH_2OH , a maior resposta analítica foi obtida com $10 \mu\text{L}$ (Figura 39). Com volumes menores de NH_2OH , a resposta analítica diminuiu devido à quantidade de reagente insuficiente para a reação quantitativa com o éster presente. Por outro lado, volumes maiores favoreceram a redução do Fe(III) a Fe(II) , prejudicando a formação do complexo e causando a diminuição do sinal analítico. O volume de $10 \mu\text{L}$ foi selecionado como ótimo, devido à maior diferença da resposta analítica do branco e porque fornece aproximadamente o dobro da quantidade estequiométrica de NH_2OH considerando a maior quantidade de éster esperada nas amostras.

Figura 39. Efeito do volume de solução de NH_2OH $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ sobre os sinais analítico (a) e do branco (b). Condições experimentais: $50 \mu\text{L}$ de linoleato de metila $0,6 \text{ \% (v/v)}$, $30 \mu\text{L}$ de NaOH $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, 15 min de reação (formação do íon hidroxamato) e $20 \mu\text{L}$ de solução de Fe(III) $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 $0,65 \text{ mol L}^{-1}$. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



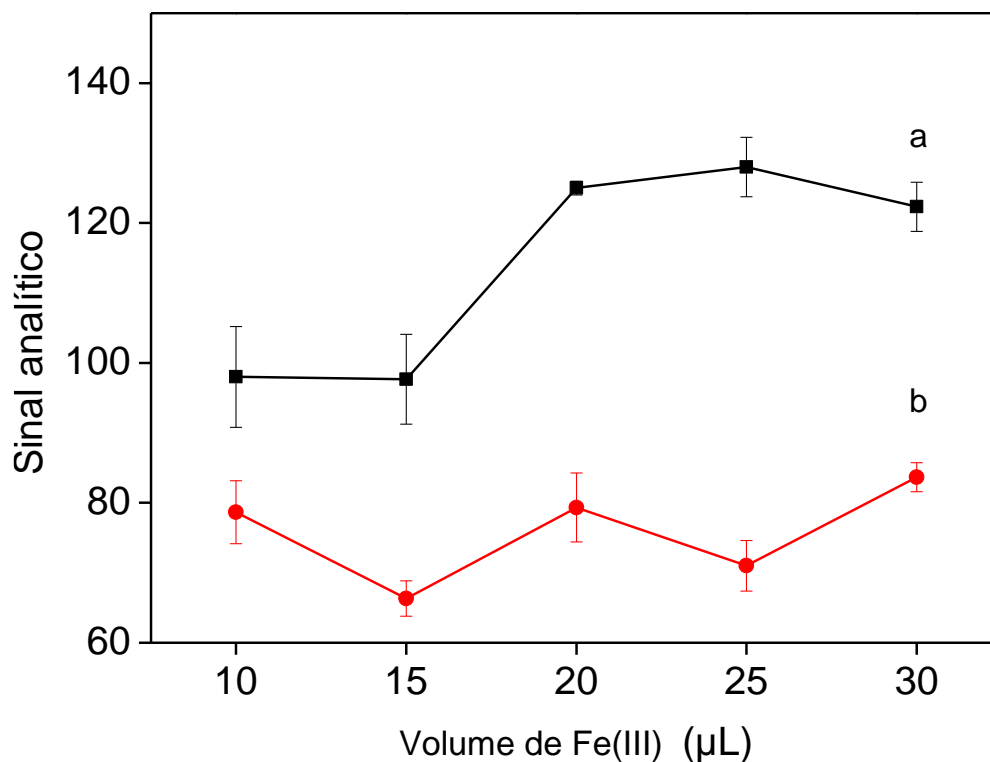
A formação do íon hidroxamato requer meio alcalino, entretanto, um excesso de NaOH favorece a precipitação de Fe(OH)_3 na segunda etapa da derivação química do analito. Na Figura 40 observa-se um aumento gradativo dos sinais analíticos e do branco com o volume de NaOH . A formação de Fe(OH)_3 torna-se mais acentuada a partir de $45 \mu\text{L}$ de NaOH , prejudicando a formação do hidroxamato. O volume de $40 \mu\text{L}$ foi então escolhido para os experimentos posteriores.

Figura 40. Efeito do volume de solução de NaOH $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ sobre os sinais analítico (a) e do branco (b). Condições experimentais: $50 \mu\text{L}$ de linoleato de metila $0,6 \text{ \% (v/v)}$, $10 \mu\text{L}$ de NH_2OH $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, 15 min de reação (formação do íon hidroxamato) e $20 \mu\text{L}$ de Fe(III) $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 $0,65 \text{ mol L}^{-1}$. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



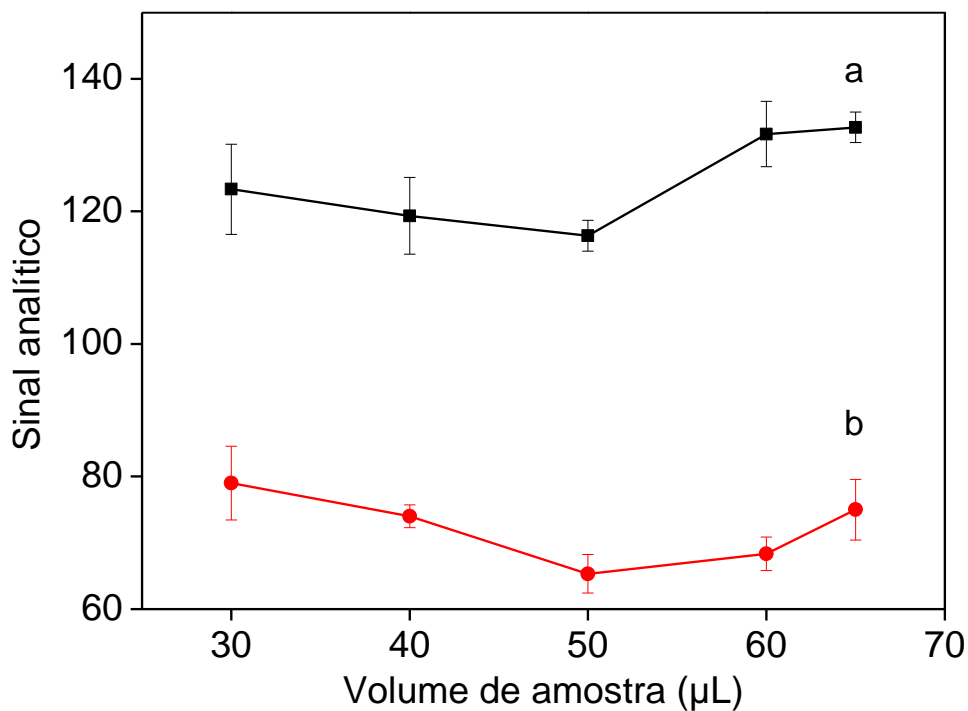
A segunda etapa da derivação química envolve a formação do complexo com Fe(III) em meio ácido (Eq. 17). Diante disso, é importante avaliar o volume de Fe(III) em HNO_3 (Figura 41), visando assegurar à concentração adequada de Fe(III) , e garantir que a reação seja conduzida em condição apropriada de acidez, favorecendo a formação do complexo e evitando a precipitação de Fe(OH)_3 . Com o volume de $25 \mu\text{L}$ ocorreu a diminuição dos sinais analíticos, pois o excesso de ácido afeta a formação do complexo, porque o ligante hidroxamato é a base conjugada de um ácido fraco (ácido hidroxâmico). Assim, o volume de $25 \mu\text{L}$ foi selecionado como ótimo por resultar na maior diferença da resposta analítica do branco.

Figura 41. Efeito do volume de solução de Fe(III) 8 mmol L^{-1} em HNO_3 $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ sobre os sinais analítico (a) e do branco (b). Condições experimentais: $50 \mu\text{L}$ de linoleato de metila $0,6 \text{ \% (v/v)}$, $10 \mu\text{L}$ de NH_2OH $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, $40 \mu\text{L}$ de NaOH $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ e 15 min de reação (formação do ion hidroxamato). Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$)



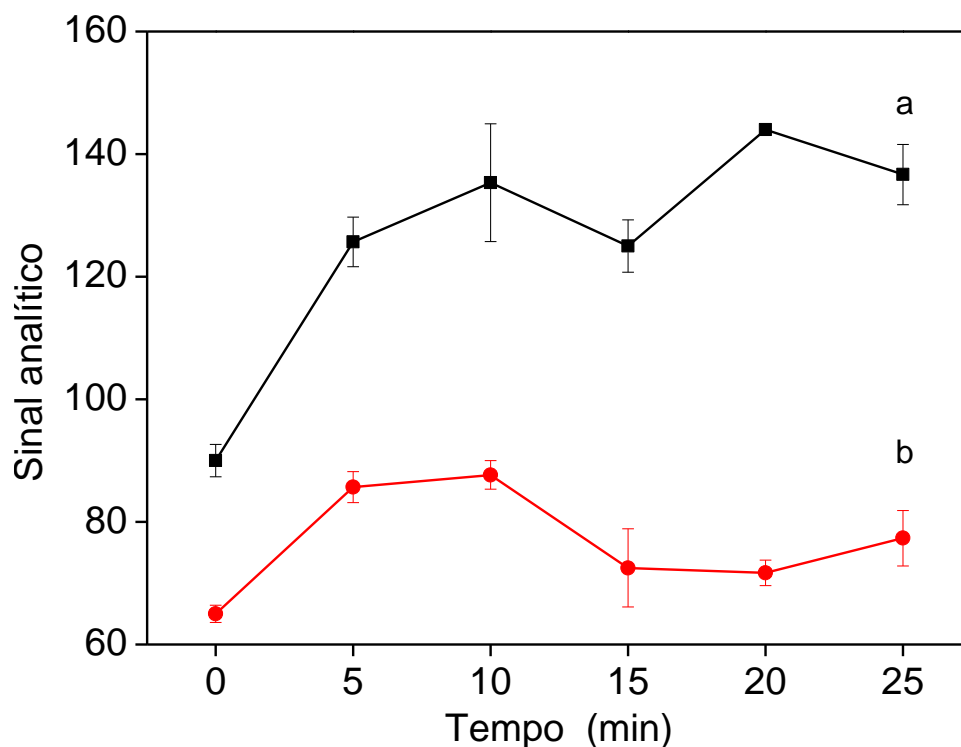
O efeito do volume de amostra foi avaliado utilizando uma solução de linoleato de metila $0,6 \text{ \% (v/v)}$, com a finalidade de aumentar a sensibilidade (Figura 42). O sinal analítico aumentou até $60 \mu\text{L}$ de amostra, e o efeito não significativo na resposta analítica com volumes maiores que $60 \mu\text{L}$, indica quantidade insuficiente de reagente. Assim, escolheu-se $60 \mu\text{L}$ de amostra como o volume ótimo.

Figura 42. Efeito do volume de amostra, simulada com solução de linoleato de metila 0,6 % (v/v), sobre os sinais analítico (a) e do branco (b). Condições experimentais: 10 μL de NH_2OH 0,30 mol L^{-1} , 40 μL de NaOH 0,30 mol L^{-1} , 15 min de reação (formação do íon hidroxamato) e 25 μL de Fe(III) 8 mmol L^{-1} preparado em HNO_3 0,65 mol L^{-1} . Valores referem-se à média \pm desvio padrão (n = 3)



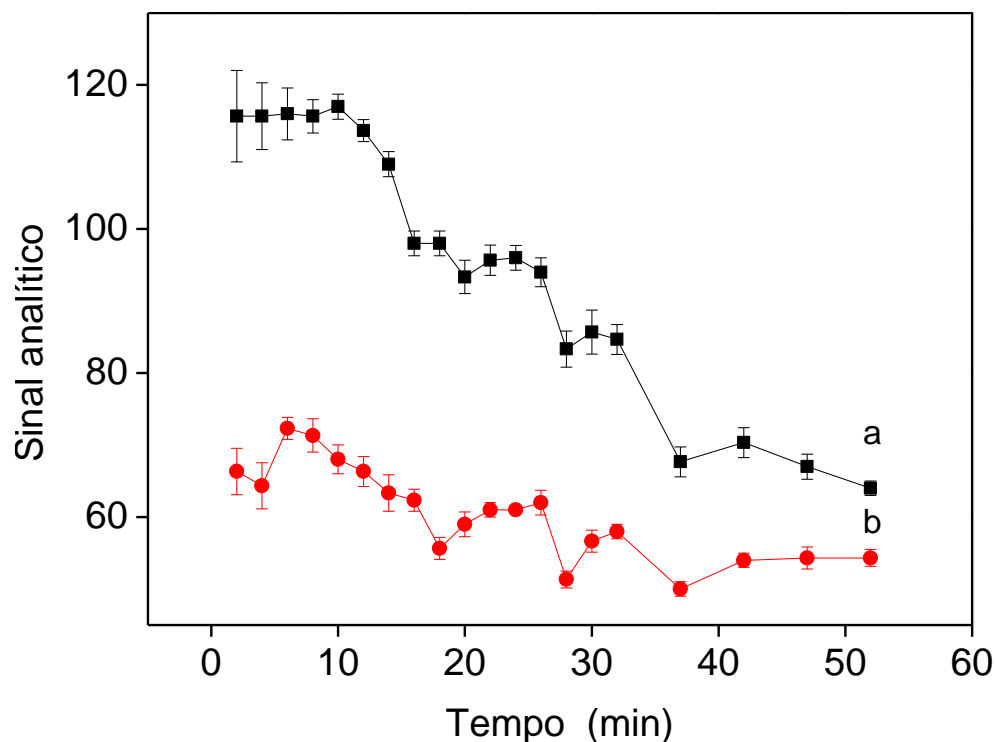
Foi avaliado o efeito do tempo para formação do íon hidroxamato, com a finalidade de trabalhar com o menor tempo de reação e em situação de estado estacionário. Como mostra a Figura 43, houve um aumento no sinal analítico e uma diminuição do sinal do branco até 20 min, selecionado para os próximos experimentos.

Figura 43. Efeito do tempo de reação para formação do íon hidroxamato sobre os sinais analítico (a) e do branco (b). Condições experimentais: 60 μL de linoleato de metila 0,6 % (v/v), 10 μL de NH_2OH 0,20 mol L^{-1} , 40 μL de NaOH 0,30 mol L^{-1} e 25 μL de Fe(III) 8 mmol L^{-1} preparado em HNO_3 0,65 mol L^{-1} . Valores referem-se à média \pm desvio padrão (n = 3)

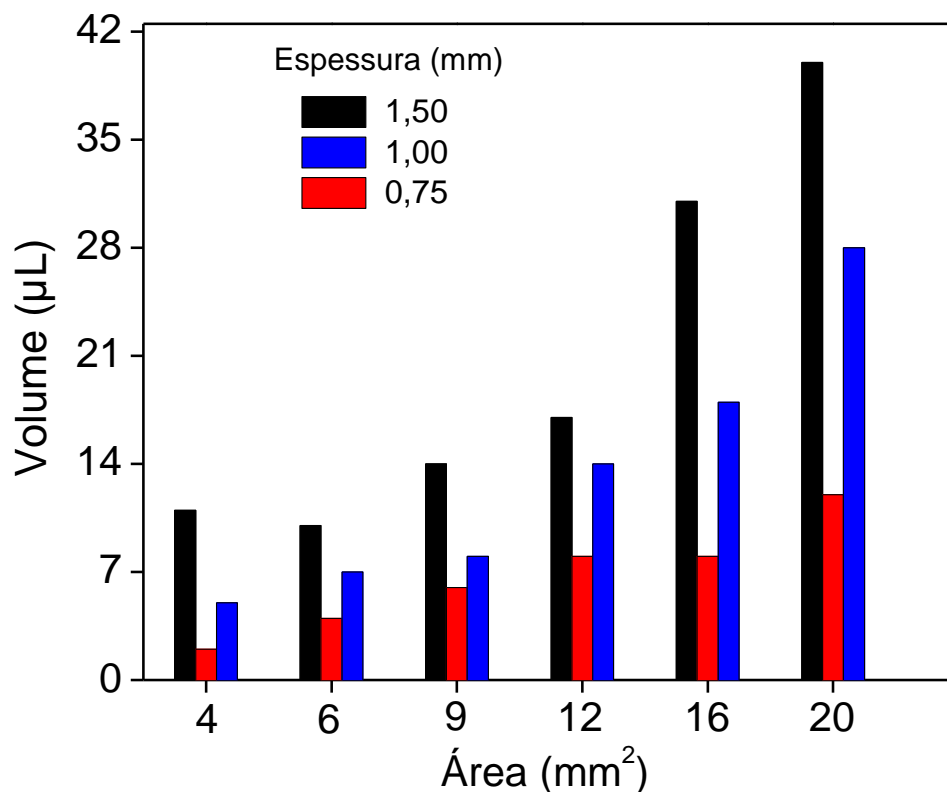


Com o objetivo de diminuir os erros nas medidas analíticas é desejável a formação de um complexo estável no suporte, especialmente visando análises *in situ*. Como mostra a Figura 44, o complexo é estável até 10 min, tempo suficiente para realizar as medidas fotométricas após a formação do produto.

Figura 44. Efeito do tempo de reação entre o hidroxamato e o Fe(III) sobre os sinais analítico (a) e do branco (b). Condições experimentais: 60 μL de linoleato de metila 0,6 % (v/v), 10 μL de NH_2OH 0,20 mol L^{-1} , 40 μL de NaOH 0,30 mol L^{-1} , 20 min de reação (formação do íon hidroxamato) e 25 μL de Fe(III) 8 mmol L^{-1} preparado em HNO_3 0,65 mol L^{-1} . Valores referem-se à média \pm desvio padrão (n = 3)

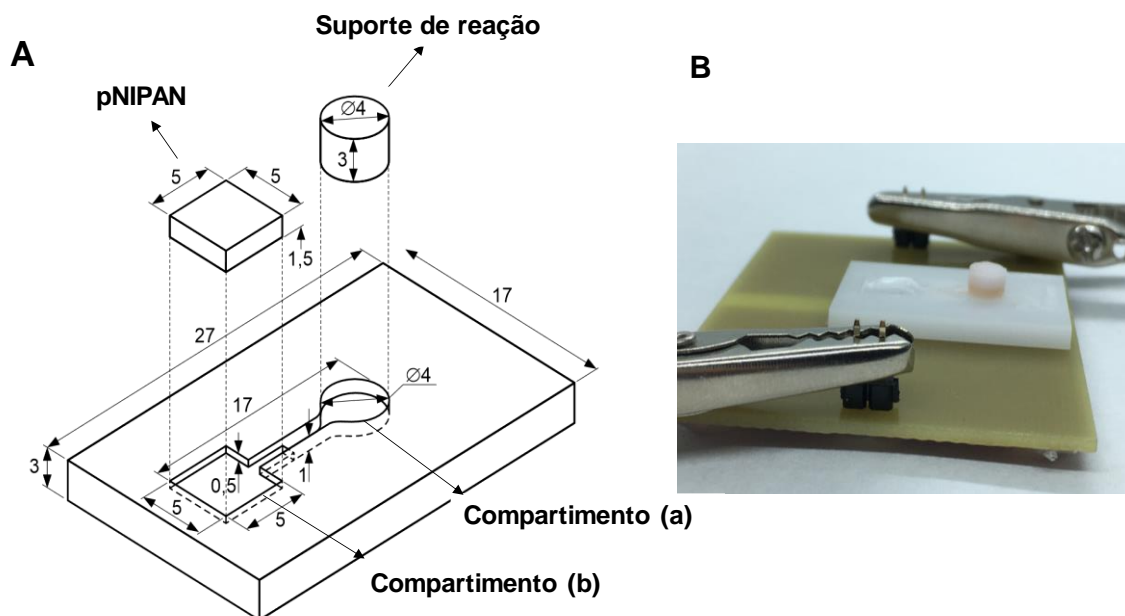


O pNIPAN foi avaliado como compartimento dos reagentes ($\text{NH}_2\text{OH} + \text{NaOH}$ e $\text{Fe(III)} + \text{HNO}_3$), entretanto, o material reteve eficientemente somente o Fe(III) em HNO_3 . Diante disso, foi avaliado o efeito da espessura e o tamanho necessário para o pNIPAN reter 25 μL da solução de Fe(III)/HNO_3 , volume ótimo definido anteriormente (Figura 41). Essa condição foi alcançada com o polímero com 1,5 mm de espessura e tamanho de 4 x 5 mm (área de 20 mm^2), como mostra a Figura 45.

Figura 45. Efeito da área e espessura do pNIPAN na retenção da solução de Fe(III)

O dispositivo microfluídico foi otimizado com o objetivo de definir as melhores condições para favorecer a formação do hidroxamato e posterior formação do complexo com o Fe(III). No dispositivo microfluídico, foram fixados o tamanho (4 mm) e a profundidade (3 mm) do compartimento para o suporte de reação (Figura 46a) e foi avaliado o tamanho e a profundidade do compartimento para o pNIPAN, de 4,0 a 7,0 mm e 0,6 a 1,2 mm (Figura 46b). Também foi avaliada a profundidade do canal (de 0,3 a 1,0 mm) que vai direcionar a solução de Fe(III) eliminada do pNIPAN até o suporte de reação. As condições definidas como ótimas foram 5,0, 1,0 e 0,5 mm (Figura 46).

Figura 46. Representação esquemática (A) e fotografia (B) do dispositivo microfluídico para a quantificação de biodiesel em misturas de diesel. As distâncias são dadas em mm



8.3.3 Características analíticas

Após a otimização, resposta linear foi estimada de 0,1–0,6 % (v/v) de linoleato de metila, descrita pela equação $G = 69,6 + 2,1C$ ($r = 0,999$). O CV e o LD foram estimados em 4,0% ($n = 10$) e 0,04 % (v/v). O procedimento utiliza apenas 60 μL de amostra, diluída 1:50 (v/v) em etanol, 233 μg de NH_2OH , 480 μg de NaOH , 14 μg de Fe(III) e equivalente a 1,2 μL de HNO_3 69 % (v/v) por análise.

Recuperações entre 88 a 115% foram estimadas para amostras preparadas pela adição de biodiesel obtido de diferentes matérias-primas a diesel S10 ou S500 (Tabela 20). Isso demonstra a ausência de efeitos de matriz, o que é uma característica importante, porque diferentes matérias-primas têm sido utilizadas na produção do biodiesel. Para avaliar a exatidão, amostras de misturas de biodiesel:diesel foram analisadas pelo procedimento proposto e de referência (MIR) (15) (Tabela 21) e os resultados comparados pelo teste t pareado. O valor calculado (0,19) foi abaixo do valor crítico (2,01), indicando que os resultados são concordantes a nível de 95% de confiança.

Tabela 20. Porcentagens de recuperações de biodiesel produzido de diferentes matérias-primas de blendas com o diesel S10 ou S500

Matéria-prima %(v/v)	Biodiesel %(v/v)*		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
Biodiesel com diesel S10			
Óleo de soja/gordura animal (70/30)	7,5	8,1 ± 0,6	108 ± 8
Óleo de soja/gordura animal (90/10)	10,0	10,9 ± 0,3	111 ± 3
Óleo de soja/gordura animal (70/30)	10,0	9,8 ± 0,8	98 ± 8
Óleos de soja e algodão (90/10)	15,0	16,3 ± 1,9	109 ± 13
Biodiesel com diesel S500			
Óleo de soja/gordura animal (90/10)	7,5	8,6 ± 0,7	115 ± 10
Óleo de soja (100)	10,0	10,0 ± 0,4	100 ± 4
Óleo de soja (100)	15,0	15,5 ± 0,3	104 ± 2
Óleo de soja/gordura animal (70/30)	20,0	18,1 ± 0,3	90 ± 2
Óleos de soja e algodão/gordura animal (93/5/2)	25,0	22,2 ± 0,7	88 ± 3

*Média ± desvio padrão (n = 3)

Tabela 21. Quantidades de biodiesel determinadas em amostras de biodiesel:diesel pelo procedimento proposto e de referência

Amostra	Biodiesel %(v/v)*		
	Proposto	Referência (15)	**F _{cal}
1	13,4 ± 1,5	14,8 ± 0,5	9,0
2	12,7 ± 0,4	14,1 ± 0,2	4,0
3	16,4 ± 1,5	16,1 ± 0,7	4,6
4	16 ± 2	17 ± 1	4,6
5	22 ± 3	19 ± 1	8,4
6	19 ± 0	18,6 ± 0,2	-

*Média ± desvio padrão (n = 3)

**F_{crítico} = 19 (95% de confiança)

Algumas características analíticas dos procedimentos utilizados para a quantificação da quantidade de biodiesel na mistura biodiesel:diesel são apresentadas na Tabela 22. O CV do procedimento proposto foi similar aos procedimentos baseados em espectrofotometria Vis (151) e UV (174) e significativamente melhor que o obtido no procedimento baseado em cromatografia líquida de alto desempenho com detecção espectrofotométrica no UV (153). O LD e a faixa de resposta linear são compatíveis com o limite mínimo de biodiesel (10 %v/v) que deve ser adicionado ao diesel de acordo com a legislação vigente. O procedimento proposto utiliza etanol, um solvente menos tóxico quando comparado aos procedimentos alternativos que utilizam hexano (153) e heptano (151,174). O consumo de etanol no procedimento proposto é *ca.* 20 vezes menor que o procedimento em fluxo (13) e *ca.* 10 vezes menor no procedimento fotométrico explorando imagens digitais obtidas com *smartphone* (43). O consumo de NH_2OH e Fe(III) foram *ca.* 4 e 16 vezes menores que o procedimento em fluxo (13) e *ca.* 4 e 5 vezes menores quando comparado ao procedimento fotométrico por imagens digitais (43). Assim, destaca-se que o procedimento proposto atende aos requisitos da química verde, por utilizar um solvente menos tóxico e pequenas quantidades de reagente e solvente.

Tabela 22. Características analíticas dos procedimentos para a quantificação do teor de éster na mistura com o diesel

Procedimento	Faixa linear %(v/v)	LD %(v/v)	Consumo de solvente orgânico (mL)¹	CV (%)	Referência
HPLC	$(0,09-2) \times 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	12,0 (hexano)	8,0	(153)
UV-Vis	0,01–0,60	$8 \cdot 10^{-4}$	10,0 (heptano)	4,0	(151)
UV	0,002–0,03	$6 \cdot 10^{-4}$	9,3 (heptano)	3,7	(174)
FIA-SP	0,10–2,60	0,03	2,2 (etanol)	0,20	(13)
<i>Spot test /DIP-smartphone</i>	0,06–0,80	0,02	1,0 (etanol)	0,9	(43)
Este trabalho	5,0–30,0	0,04	0,110 (etanol)	4,0	–

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência; ¹ volumes consumidos por análise

8.4 Conclusões

Um dispositivo microfluídico prático e de baixo custo foi desenvolvido para a quantificação de biodiesel em misturas de diesel usando DIP obtidas por *smartphone*. O uso de etanol como solvente para dissolver a amostra e preparar os reagentes minimizou o risco de efeitos de matriz de biodiesel produzido de diferentes matérias-primas (óleos de soja e algodão e gordura animal) e tornou viável o uso de soluções padrão preparadas em etanol para calibração. Devido às diluições de 50 vezes, foi possível analisar amostras que contém biodiesel em misturas com diesel S10 ou S500, porque minimizou o efeito de corantes contidos nas amostras.

As características analíticas como faixa de resposta linear, limites de detecção e quantificação, precisão indicam que o procedimento é uma alternativa confiável ao procedimento de referência baseado em MIR.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta Tese, foram desenvolvidos procedimentos analíticos explorando DIP obtidas por um *smartphone* para a quantificação de metanol, Ca e Mg em biodiesel, e de biodiesel em mistura com o diesel e um procedimento volumétrico para quantificar biodiesel em mistura com o diesel ou óleo vegetal. A estratégia de calibração MEC foi explorada para contornar efeito de matriz na análise de biodiesel por procedimentos espectrofotométricos e uma proposta análoga foi pioneiramente desenvolvida para a calibração utilizando DIP, efetivamente contornando o efeito de interferência.

No primeiro procedimento desenvolvido para a quantificação de metanol em biodiesel foi empregada extração líquido-líquido com água para separar o metanol do biodiesel e derivação química com o reagente de *Schiff*. A derivação química do metanol ocorreu dentro de um tubo Eppendorf® de 1,5 mL, com volumes de amostra e reagentes da ordem de microlitros, assim reduzindo o consumo de reagentes e a geração de resíduos. O procedimento apresentou boa precisão (CV = 3,7%) e excelentes recuperações (de $93 \pm 11\%$ a 109 ± 5) e resultados concordantes com o procedimento de referência, sendo atrativo para análises de rotina. Visando evitar a derivação química do analito e explorando a volatilidade do metanol, foi desenvolvido um segundo procedimento analítico, no qual foi pioneiramente proposto um sistema simples e de baixo custo para a microdestilação do metanol do biodiesel. A quantificação fotométrica foi baseada na descoloração de uma solução ácida de KMnO_4 pela oxidação do analito a formaldeído. O sistema de microdestilação foi composto por um tubo Eppendorf® de 1,5 mL (contendo o KMnO_4) que ficava suspenso dentro de tubo Falcon® de 50 mL, contendo o biodiesel. A proposta foi efetiva para a separação do metanol do biodiesel, evitando a necessidade de derivação química do analito, visto que o metanol é a espécie mais volátil encontrada em biodiesel. O procedimento apresentou CV de 4,8% e recuperações de $92 \pm 4\%$ a 102 ± 1 . Em ambos os procedimentos foram obtidos resultados concordantes com o procedimento de referência baseado em GC-FID a nível de 95% de confiança.

Na quantificação de Ca e Mg em biodiesel foi empregado etanol para a formação de uma fase única entre o biodiesel e as soluções reagentes. A diluição da amostra também contribui para minimizar efeitos de matriz, o que é importante devido às diferentes matérias-primas utilizadas para a produção do biodiesel. O procedimento, realizado em tubos Eppendorf® de 1,5 mL, foi baseado na descoloração da solução alcalina de Negro de Eriocromo T, devido à formação de

complexos com os analitos. Uma curva de calibração construída com soluções padrão preparadas a partir de Ca ou Mg pode ser utilizada para a quantificação dos teores totais, conforme requerido pela legislação. Os resultados foram concordantes com os obtidos por ICP-OES a nível de 95% de confiança e o procedimento proposto é significativamente mais simples, rápido e limpo que o procedimento de referência.

Para a quantificação de biodiesel em mistura com o diesel ou óleo vegetal, foi proposto um procedimento volumétrico simples, limpo e inovador utilizando apenas etanol e água. Precisão (CV = 6,8%) e exatidão foram demonstradas e a alternativa proposta é atraente para o controle de qualidade de blends de diesel e monitoramento do processo de transesterificação. No segundo procedimento para quantificação de biodiesel em mistura com o diesel, foi construído um dispositivo microfluídico para análises *in situ*. O procedimento apresentou CV = 4,0% e recuperações de $88 \pm 3\%$ a 115 ± 10 . Os resultados foram concordantes com os procedimentos de referência baseados em MIR e GC-FID a nível de 95% de confiança.

A calibração MEC foi eficiente para contornar efeitos de matriz na quantificação espectrofotométrica de índice de iodo e de glicerol livre em biodiesel produzido de diversas matérias-primas (óleos de soja e algodão e gordura animal), superando dificuldades observadas anteriormente. A estratégia combinando DIP e medidas multicanais foi efetiva para contornar a interferência de glicerol. Ambas as estratégias de calibração produziram resultados mais exatos do que os procedimentos de calibração externa, demonstrando a eficiência para contornar efeitos de matriz e interferências.

Todos os procedimentos desenvolvidos atenderam ao objetivo principal desta Tese, pois são práticos, viáveis para análises de rotina e mais limpos, pois consomem pequenas quantidades de solventes orgânicos e reagentes, e têm baixa geração de resíduos. São, portanto, alternativas viáveis aos procedimentos oficiais.

REFERÊNCIAS

1. NOTA TÉCNICA - Impactos da pandemia de Covid-19 no mercado brasileiro de combustíveis - Reflexos na demanda de combustíveis. Empresas Pesqui energética. 2020.
2. Lôbo IP, Ferreira SLC, Cruz RS. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quim Nova*. 2009;32(6):1596–608.
3. Baptista G, Milanez AY. Biodiesel e diesel verde no Brasil: Panorama recente e perspectivas. 2022;28(56):41–71.
4. Soares S, Rocha FRP. Fast spectrophotometric determination of iodine value in biodiesel and vegetable oils. *J Braz Chem Soc*. 2018;29(8):1701–6.
5. Pereira AC, Reis BF, Rocha FRP. An air carrier flow system for the spectrophotometric determination of water in biodiesel exploiting bleaching of the cobalt chloride complex. *Talanta*. 2015;131:21–5.
6. Ribeiro MS, Rocha FRP. A single-phase spectrophotometric procedure for in situ analysis of free glycerol in biodiesel. *Microchem J*. 2013;106:23–6.
7. Knothe G, Gerpen J V, Krahl J. *The biodiesel handbook*. 2nd ed. Knothe G, Van Gerpen J, Krahl J, editors. Champaign: AOCS Publishing; 2005.
8. Knothe G. Analyzing biodiesel: Standards and other methods. *J Am Oil Chem Soc*. 2006;83(10):823–33.
9. Amais RS, Teixeira LSG, Rocha FRP. Greener procedures for biodiesel quality control. *Anal Methods*. 2015;7(11):4396–418.
10. Monteiro MR, Ambrozin ARP, Lião LM, Ferreira AG. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta*. 2008;77(2):593–605.
11. Paraschivescu MC, Alley EG, French WT, Hernandez R, Armbrust K. Determination of methanol in biodiesel by headspace solid phase microextraction. *Bioresour Technol*. 2008;99(13):5901–5.
12. European Standard – EN 14111, Determination of iodine value in fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Volumetric titration. 2003;
13. Soares S, Melchert WR, Rocha FRP. A flow-based procedure exploiting the lab-in-syringe approach for the determination of ester content in biodiesel and diesel/biodiesel blends. *Talanta*. 2017;174:556–61.

14. European Standard. – EN 14103, Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. 2011;
15. European Standard – EN 14078, Liquid petroleum products – Determination of fatty methyl ester (FAME) content in middle distillates – Infrared spectrometry method. 2014;
16. Pimentel FM, Ribeiro GMGS, da Cruz RS, Stragevitch L, Pacheco Filho JGA, Teixeira LSG. Determination of biodiesel content when blended with mineral diesel fuel using infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Microchem J.* 2006;82(2):201–6.
17. Anastas P, Eghbali N. *Green Chemistry: Principles and Practice.* Chem Soc Rev. 2010;39(1):301–12.
18. Lenardão EJ, Dabdoub MJ, Batista CF. Green chemistry – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. 2003;26(1):123–9.
19. Erythropel HC, Zimmerman JB, Winter TM, Petitjean L, Melnikov F, Lam CH, et al. The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles. *Green Chem.* 2018;20(9):1929–61.
20. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *Trends Anal Chem.* 2013;50:78–84.
21. Gama MR, Melchert WR, Paixão TRLC, Rocha FRP. An overview of the Brazilian contributions to Green Analytical Chemistry. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91(suppl 1).
22. Sajid M, Płotka-Wasyłka J. Green analytical chemistry metrics: A review. *Talanta.* 2022;238(2):123046.
23. Zuin VG, Segatto ML, Ramin LZ. Green Chemistry in Analytical Chemistry. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology.* New York, NY: Springer New York; 2018. p. 1–24.
24. Castro LF, Freitas S V., Duarte LC, Souza JAC, Paixão TRLC, Coltro WKT. Salivary diagnostics on paper microfluidic devices and their use as wearable sensors for glucose monitoring. *Anal Bioanal Chem.* 2019;411(19):4919–28.
25. Souza FR, Alves GL, Coltro WKT. Capillary-driven toner-based microfluidic devices for clinical diagnostics with colorimetric detection. *Anal Chem.* 2012;84(21):9002–7.

26. Freitas RC, Orzari LO, Ferreira LMC, Paixão TRLC, Coltro WKT, Vicentini FC, et al. Electrochemical determination of melatonin using disposable self-adhesive inked paper electrode. *J Electroanal Chem.* 2021;897:115550.
27. Coltro WTK, Fracassi Da Silva JA, Carrilho E. Rapid prototyping of polymeric electrophoresis microchips with integrated copper electrodes for contactless conductivity detection. *Anal Methods.* 2011;3(1):168–72.
28. Giakisikli G, Anthemidis AN. An automatic stirring-assisted liquid–liquid microextraction system based on lab-in-syringe platform for on-line atomic spectrometric determination of trace metals. *Talanta.* 2017;166:364–8.
29. Soares S, Lima MJA, Rocha FRP. A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone. *Microchem J.* 2017;133:195–9.
30. Doménech-Carbó MT, Doménech-Carbó A. Spot tests: past and present. *ChemTexts.* 2022;8(1):4.
31. Tobiszewski M, Mechlinska A, Namie J. Green analytical chemistry—theory and practice. *Chem Soc Rev.* 2010;39(8):2869–78.
32. Gao X, Yang B, Tang Z, Luo X, Wang F, Xu H, et al. Determination of phthalates released from paper packaging materials by solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci.* 2014;52(5):383–9.
33. Pilařová V, Sultani M, Ask KS, Nováková L, Pedersen-Bjergaard S, Gjelstad A. One-step extraction of polar drugs from plasma by parallel artificial liquid membrane extraction. *J Chromatogr B.* 2017;1043:25–32.
34. Maya F, Horstkotte B, Estela JM, Cerdà V. Lab in a syringe: Fully automated dispersive liquid-liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection. *Anal Bioanal Chem.* 2012;404(3):909–17.
35. Batista AD, Amais RS, Rocha FRP. Liquid–liquid microextraction in sequential injection analysis for the direct spectrophotometric determination of acid number in biodiesel. *Microchem J.* 2016;124:55–9.
36. Doh I-J, Min HJ, Aguilera CPC, Lim T, Applegate BM, Bae E. Portable bioluminescence detection for food safety: smartphone vs. silicon photomultiplier. In: Kim MS, Cho B-K, Chin BA, editors. *Sensing for Agriculture and Food Quality and Safety XI.* SPIE; 2019. p. 13.
37. Granica M, Tymecki Ł. Analytical aspects of smart (phone) fluorometric measurements. *Talanta.* 2019;197:319–25.

38. Rateni G, Dario P, Cavallo F. Smartphone-Based Food Diagnostic Technologies: A Review. *Sensors*. 2017;17(6):1453.
39. Rezazadeh M, Seidi S, Lid M, Pedersen-Bjergaard S, Yamini Y. The modern role of smartphones in analytical chemistry. *TrAC Trends Anal Chem*. 2019;118:548–55.
40. Gonçalves IC, Soares S, Rocha FRP. Exploiting microdistillation and smartphone-based digital-image colorimetry for determination of protein in foods. *Microchem J*. 2023;188:108461.
41. Silva AFS, Rocha FRP. Innovative prediction of milk microbiological quality from pH measurements by digital imaging photometry. *J Food Compos Anal*. 2022;114:104715.
42. Martins LC, Souza Silva AF, Moraes LMB, Gonçalves IC, Godoy BBR, Rocha FRP. A Greener and faster approach for determination of phenolic compounds by smartphone-based colorimetry. *1st Int Electron Conf Food Sci Funct Foods*. 2020;70(1):20.
43. Soares S, Nunes LC, Melchert WR, Rocha FRP. Spot test exploiting smartphone-based digital images for determination of biodiesel in diesel blends. *Microchem J*. 2020;152:104273.
44. Hernández-Neuta I, Neumann F, Brightmeyer J, Ba Tis T, Madaboosi N, Wei Q, et al. Smartphone-based clinical diagnostics: towards democratization of evidence-based health care. *J Intern Med*. 2019;285(1):19–39.
45. Hunt B, Ruiz AJ, Pogue BW. Smartphone-based imaging systems for medical applications: a critical review. *J Biomed Opt*. 2021;26(04):1–22.
46. Yang K, Peretz-Soroka H, Liu Y, Lin F. Novel developments in mobile sensing based on the integration of microfluidic devices and smartphones. *Lab Chip*. 2016;16(6):943–58.
47. Lima MJA, Sasaki MK, Marinho OR, Freitas TA, Faria RC, Reis BF, et al. Spot test for fast determination of hydrogen peroxide as a milk adulterant by smartphone-based digital image colorimetry. *Microchem J*. 2020;157:105042.
48. Bueno D, Muñoz R, Marty JL. Fluorescence analyzer based on smartphone camera and wireless for detection of Ochratoxin A. *Sensors Actuators B Chem*. 2016;232:462–8.
49. Alahmad W, Varanusupakul P, Kaneta T. Chemiluminescence paper-based analytical devices. In: *Paper-based analytical devices for chemical analysis and diagnostics*. Elsevier; 2022. p. 169–82.

50. Luo W, Deng J, He J, Han Z, Huang C, Li Y, et al. A smartphone-based multi-wavelength photometer for on-site detection of the liquid colorimetric assays for clinical biochemical analyses. *Sensors Actuators B Chem.* 2021 Feb;329:129266.
51. Silva AFS, Rocha FRP. A novel approach to detect milk adulteration based on the determination of protein content by smartphone-based digital image colorimetry. *Food Control.* 2020 Sep;115:107299.
52. Gao N, Huang P, Wu F. Colorimetric detection of melamine in milk based on Triton X-100 modified gold nanoparticles and its paper-based application. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2018;192:174–80.
53. Acevedo MSMSF, Lima MJA, Nascimento CF, Rocha FRP. A green and cost-effective procedure for determination of anionic surfactants in milk with liquid-liquid microextraction and smartphone-based photometric detection. *Microchem J.* 2018;143:259–63.
54. Schlesner SK, Voss M, Helfer GA, Costa AB, Cichoski AJ, Wagner R, et al. Smartphone-based miniaturized, green and rapid methods for the colorimetric determination of sugar in soft drinks. *Green Anal Chem.* 2022;1:100003.
55. Hosu O, Lettieri M, Papara N, Ravalli A, Sandulescu R, Cristea C, et al. Colorimetric multienzymatic smart sensors for hydrogen peroxide, glucose and catechol screening analysis. *Talanta.* 2019;204:525–32.
56. Trofimchuk E, Nilghaz A, Sun S, Lu X. Determination of norfloxacin residues in foods by exploiting the coffee-ring effect and paper-based microfluidics device coupling with smartphone-based detection. *J Food Sci.* 2020;85(3):736–43.
57. Machado JMD, Soares RRG, Chu V, Conde JP. Multiplexed capillary microfluidic immunoassay with smartphone data acquisition for parallel mycotoxin detection. *Biosens Bioelectron.* 2018;99:40–6.
58. Color converter [Internet]. [cited 2022 Jun 5]. Available from: <http://colormine.org/color-converter>
59. Pohanka M. Small camera as a handheld colorimetric tool in the analytical chemistry. *Chem Pap.* 2017;71(9):1553–61.
60. Ballesteros JI, Caleja-Ballesteros HJR, Villena MC. Digital image-based method for iron detection using green tea (*Camellia sinensis*) extract as natural colorimetric reagent. *Microchem J.* 2021;160:105652.
61. Capitán-Vallvey LF, López-Ruiz N, Martínez-Olmos A, Erenas MM, Palma AJ. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Anal Chim Acta.* 2015;899:23–56.

62. Fernandes GM, Silva WR, Barreto DN, Lamarca RS, Gomes PCFL, Petrucci JFS, et al. Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry – A review. *Anal Chim Acta*. 2020;1135:187–203.
63. Koenderink J, Doorn A V., Gegenfurtner K. Graininess of RGB-display space. *Iperception*. 2018 Sep 23;9(5):204166951880397.
64. Barreto JA, Assis RS, Santos LB, Cassella RJ, Lemos VA. Pressure variation in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction associated with digital image colorimetry: Determination of cobalt in food samples. *Microchem J*. 2020;157:105064.
65. Silva AFS, Gonçalves IC, Rocha FRP. Smartphone-based digital images as a novel approach to determine formaldehyde as a milk adulterant. *Food Control*. 2021;125:107956.
66. Porto ISA, Neto JHS, Santos LO, Gomes AA, Ferreira SLC. Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry. *Microchem J*. 2019;149:104031.
67. Franco MOK, Suarez WT, Santos VB. Digital image method smartphone-based for furfural determination in sugarcane spirits. *Food Anal Methods*. 2017;10(2):508–15.
68. Soares S, Campos KRR, Melchert WR, Rocha FRP. A spot test for total esters determination in sugarcane spirits exploiting smartphone-based digital images. *Anal Methods*. 2020;12(31):3918–23.
69. Guo J, Wong JXH, Cui C, Li X, Yu HZ. A smartphone-readable barcode assay for the detection and quantitation of pesticide residues. *Analyst*. 2015;140(16):5518–25.
70. Lima CM de, Fernandes DDS, Pereira GE, Gomes AA, Araújo MCU, Diniz PHGD. Digital image-based tracing of geographic origin, winemaker, and grape type for red wine authentication. *Food Chem*. 2020;312:126060.
71. Fernandes DDS, Romeo F, Krepper G, Di Nezio MS, Pistonesi MF, Centurión ME, et al. Quantification and identification of adulteration in the fat content of chicken hamburgers using digital images and chemometric tools. *LWT*. 2019;100:20–7.
72. Koyama K, Tanaka M, Cho BH, Yoshikawa Y, Koseki S. Predicting sensory evaluation of spinach freshness using machine learning model and digital images. *PLoS One*. 2021;16:0248769.

73. Li S, Zhang Q, Lu Y, Zhang D, Liu J, Zhu L, et al. Gold nanoparticles on graphene oxide substrate as sensitive nanoprobe for rapid L-cysteine detection through smartphone-based multimode analysis. *ChemistrySelect*. 2018;3(35):10002–9.
74. Li YD, Li WY, Chai HH, Fang C, Kang YJ, Li CM, et al. Chitosan functionalization to prolong stable hydrophilicity of cotton thread for thread-based analytical device application. *Cellulose*. 2018;25(8):4831–40.
75. Fan Y, Li J, Guo Y, Xie L, Zhang G. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement*. 2021;171:108829.
76. Avidad MA, Castillo AS, Cuéllar MP, Acemel MA, Pegalajar MC, Vallvey LFC. Printed disposable colorimetric array for metal ion discrimination. *Anal Chem*. 2014;86(17):8634–41.
77. Hakonen A, Beves JE. Hue parameter fluorescence identification of edible oils with a smartphone. *ACS Sensors*. 2018;3(10):2061–5.
78. Lazaro A, Boada M, Villarino R, Girbau D. Color measurement and analysis of fruit with a battery-less NFC sensor. *Sensors*. 2019;19(7):1741.
79. Mathaweesansurn A, Maneerat N, Choengchan N. A mobile phone-based analyzer for quantitative determination of urinary albumin using self-calibration approach. *Sensors Actuators B Chem*. 2017;242:476–83.
80. Mermer K, Paluch J, Kozak J. Smartphone-based digital image colorimetry for the determination of vancomycin in drugs. *Monatshefte für Chemie*. 2022;801–9.
81. Kang SP, East AR, Trujillo FJ. Colour vision system evaluation of bicolour fruit: A case study with 'B74' mango. *Postharvest Biol Technol*. 2008;49(1):77–85.
82. Carvalho TCL, Nunes CA. Smartphone-based method for the determination of chlorophyll and carotenoid contents in olive and avocado oils: An approach with calibration transfer. *J Food Compos Anal*. 2021;104:104164.
83. Bennett C, Sookwong P, Jakmunee J, Mahatheeranont S. Smartphone digital image colorimetric determination of the total monomeric anthocyanin content in black rice: via the pH differential method. *Anal Methods*. 2021;13(30):3348–58.
84. Yam KL, Papadakis SE. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *J Food Eng*. 2004;61(1):137–42.
85. Rovina K, Vonnie JM, Shaeera SN, Yi SX, Halid NFA. Development of biodegradable hybrid polymer film for detection of formaldehyde in seafood products. *Sens Bio-Sensing Res*. 2020;27:100310.

86. Askarian B, Tabei F, Tipton GA, Chong JW. Smartphone-based method for detecting periodontal disease. In IEEE; 2019. p. 53–5.
87. Fan Y, Li J, Guo Y, Xie L, Zhang G. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement*. 2021;171:108829.
88. Caleb J, Alshana U, Ertaş N. Smartphone digital image colorimetry combined with solidification of floating organic drop-dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of iodate in table salt. *Food Chem*. 2021 Jan;336:127708.
89. Santos LB, Assis RS, Silva UN, Lemos VA. Switchable-hydrophilicity solvent-based liquid-phase microextraction in an on-line system: Cobalt determination in food and water samples. *Talanta*. 2022 Feb;238:123038.
90. Oliveira LMA, Santos VB, Silva EKN, Lopes AS, Dantas-Filho HA. An environment-friendly spot test method with digital imaging for the micro-titration of citric fruits. *Talanta*. 2020;206:120219.
91. Chaisiwamongkhol K, Labaidae S, Pon-in S, Pinsrithong S, Bunchuay T, Phonchai A. Smartphone-based colorimetric detection using gold nanoparticles of sibutramine in suspected food supplement products. *Microchem J*. 2020;158:105273.
92. Yu L, Shi ZZ, Fang C, Zhang YY, Liu YS, Li CM. Disposable lateral flow-through strip for smartphone-camera to quantitatively detect alkaline phosphatase activity in milk. *Biosens Bioelectron*. 2015;69:307–15.
93. Neto JHS, Santos LO, Santos AMP, Novaes CG, Ferreira SLC. A new and accessible instrumentation to determine urea in UHT milk using digital image analysis. *Food Chem*. 2022 Jul;381:132221.
94. Cruz-Fernández M, Luque-Cobija MJ, Cervera ML, Morales-Rubio A, de la Guardia M. Smartphone determination of fat in cured meat products. *Microchem J*. 2017 May;132:8–14.
95. Costa AB, Helfer GA, Barbosa JLV, Teixeira ID, Santos RO, Santos RB, et al. Photometrix uvc: A new smartphone-based device for digital image colorimetric analysis using pls regression. *J Braz Chem Soc*. 2021;32(3):675–83.
96. Virgilio A, Gonçalves DA, McSweeney T, Neto JAG, Nóbrega JA, Donati GL. Multi-energy calibration applied to atomic spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2017;982:31–6.
97. Machado RC, Silva ABS, Donati GL, Nogueira ARA. Multi-energy calibration as a strategy for elemental analysis of fertilizers by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *J Anal At Spectrom*. 2018;33(7):1168–72.

98. Augusto AS, Castro JP, Sperança MA, Pereira-Filho ER. Combination of multi-energy calibration (MEC) and laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for dietary supplements analysis and determination of Ca, Mg and K. *J Braz Chem Soc.* 2019;30(4):804–12.
99. Carvalho AAC, Cozer LA, Luz MS, Nunes LC, Rocha FRP, Nomura CS. Multi-energy calibration and sample fusion as alternatives for quantitative analysis of high silicon content samples by laser-induced breakdown spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2019;34(8):1701–7.
100. Virgilio A, Nóbrega JA, Donati GL. Multi-isotope calibration for inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2018;410(3):1157–62.
101. Williams CB, Donati GL. Multispecies calibration: A novel application for inductively coupled plasma tandem mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2018;33(5):762–7.
102. Alencar MC, Gonçalves DA, Nicolodelli G, Oliveira SL, Donati GL, Caires ARL. Evaluating the applicability of multi-energy calibration as an alternative method for quantitative molecular spectroscopy analysis. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2019;221:117221.
103. European Standard – EN 14110, Determine the methanol content in Fatty Acid Methyl Esters (FAME). 2019;
104. Shishov A, Penkova A, Zabrodin A, Nikolaev K, Dmitrenko M, Ermakov S, et al. Vapor permeation-stepwise injection simultaneous determination of methanol and ethanol in biodiesel with voltammetric detection. *Talanta.* 2016;148:666–72.
105. Araujo ARTS, Saraiva MLMFS, Lima JLFC, Korn MGA. Flow methodology for methanol determination in biodiesel exploiting membrane-based extraction. *Anal Chim Acta.* 2008;613(2):177–83.
106. Helfer GA, Magnus VS, Böck FC, Teichmann A, Ferrão MF, Costa AB. PhotoMetrix: An application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. *J Braz Chem Soc.* 2017;28(2):328–35.
107. Martins GBC, Montenegro MA, Suarez PAZ. Colorimetric kit for detection of methanol in ethanol fuel for monitoring the quality of fuels. *Quim Nova.* 2014;4(1):88–100.
108. Rodríguez JG, Juan PP, Castro ML. Sequential spectrophotometric determination of methanol and iron in vinegar by a flow injection-pervaporation method. *Anal Bioanal Chem.* 2002;374(1):120–5.

109. Sharp J. Quantitative aspects of the oxidation of aliphatic alcohols by potassium permanganate: I. Methanol and ethanol. *Anal Chim Acta*. 1961;25(2):139–45.
110. Pub Chem - National center for biotechnology information - methanol [Internet]. [cited 2022 Feb 10]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/887#section=Boiling-Point>
111. Pub Chem - National center for biotechnology information - glycerol [Internet]. [cited 2022 Feb 2]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/492>
112. Rezende M, Lima AL, Silva B, Mota C, Torres E, Rocha G, et al. Biodiesel: An Overview II. *J Braz Chem Soc*. 2021;32(7):1301–44.
113. Yang XX, Wang YT, Yang YT, Feng EZ, Luo J, Zhang F, et al. Catalytic transesterification to biodiesel at room temperature over several solid bases. *Energy Convers Manag*. 2018;164:112–21.
114. Colombo K, Ender L, Barros AAC. The study of biodiesel production using CaO as a heterogeneous catalytic reaction. *Egypt J Pet*. 2017;26(2):341–9.
115. Basumatary S. Transesterification with heterogeneous catalyst in production of biodiesel: A review. *J Chem Pharm Res*. 2013;5(1):1–7.
116. Sánchez R, Maestre S, Prats S, Todolí J-L. Aerosol-phase extraction method for determination of Ca, K, Mg, and Na in biodiesel through inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Anal Chem*. 2017;89(24):13618–25.
117. Souza RM, Leocádio LG, Silveira CLP. ICP OES simultaneous determination of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, and P in biodiesel by axial and radial inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Anal Lett*. 2008;41(9):1615–22.
118. Korn MGA, Santos DCMB, Guida MAB, Barbosa IS, Passos MLC, Saraiva MLMFS, et al. Evaluation of digestion procedures for simultaneous determination of Ca, P, Mg, K and Na in biodiesel by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J Braz Chem Soc*. 2010;21(12):2278–84.
119. Pereira FM, Brum DM, Lepri FG, Cassella RJ. Extraction induced by emulsion breaking as a tool for Ca and Mg determination in biodiesel by fast sequential flame atomic absorption spectrometry (FS-FAAS) using Co as internal standard. *Microchem J*. 2014;117:172–7.
120. Zhu Y, Kitamaki Y, Numata M. Simultaneous direct determinations of Na, Mg, K, Ca, P, and S in biodiesel fuel by ICP-QMS/QMS after xylene dilution: development and application of a high-throughput method for a homogeneity assessment of a candidate reference material. *Anal Sci*. 2017;33(2):209–15.

121. Amais RS, Garcia EE, Monteiro MR, Nóbrega JA. Determination of Ca, Mg, and Zn in biodiesel microemulsions by FAAS using discrete nebulization. *Fuel*. 2012;93:167–71.
122. Shishov AY, Nikolaeva LS, Moskvina LN, Bulatov A V. Fully automated spectrophotometric procedure for simultaneous determination of calcium and magnesium in biodiesel. *Talanta*. 2015;135:133–7.
123. Sako AVF, Spudeit DA, Dupim M, Filho WPO, Saint’Pierre TD, Oliveira MAL, et al. Dual-opposite end multiple injection method applied to sequential determination of Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ ions and free and total glycerol in biodiesel by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A*. 2018;1570:148–54.
124. Shishov A, Trufanov I, Nechaeva D, Bulatov A. A reversed-phase air-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with colorimetric paper-based analytical device for the determination of glycerol, calcium and magnesium in biodiesel samples. *Microchem J*. 2019;150:104134.
125. Yappert MC, DuPre DB. Complexometric Titrations: Competition of Complexing Agents in the Determination of Water Hardness with EDTA. *J Chem Educ*. 1997 Dec 1;74(12):1422.
126. Miyashiro CS, Oliveira C, Campos E, Teleken JG. Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos residuais. *Rev Bras Energias Renov*. 2013;2(3):63–76.
127. Miller, J C. Miller MJN. *Statistics for Analytical Chemistry*. 1993. 256 p.
128. Raposo F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. *TrAC Trends Anal Chem*. 2016;77:167–85.
129. Rodríguez LC, Gracia LG, López EA, Sánchez JL. Calibration in chemical measurement processes: I. A metrological approach. *TrAC Trends Anal Chem*. 2001;20(4):195–206.
130. Hewavitharana AK. Matrix matching in liquid chromatography–mass spectrometry with stable isotope labelled internal standards—Is it necessary? *J Chromatogr A*. 2011;1218(2):359–61.
131. Castells RC, Castillo MA. Systematic errors: detection and correction by means of standard calibration, Youden calibration and standard additions method in conjunction with a method response model. *Anal Chim Acta*. 2000;423(2):179–85.

132. Fortunato FM, Catelani TA, Alfonso MSP, Filho ERP. Application of multi-energy calibration for determination of chromium and nickel in nickeliferous ores by laser-induced breakdown spectroscopy. *Anal Sci.* 2019;35(2):165–8.
133. Virgilio A, Silva ABS, Nogueira ARA, Nóbrega JA, Donati GL. Calculating limits of detection and defining working ranges for multi-signal calibration methods. *J Anal At Spectrom.* 2020;35(8):1614–20.
134. Higuera J, Silva AB, Nogueira AR. Multi-energy calibration: a practical method for determination of macro and micro nutrients in meat by ICP OES. *J Braz Chem Soc.* 2019;30(12):20190171.
135. Rocha JA, Menezes EV, Fonseca FSA, Brandão MM, Santos KT, Oliveira DA de, et al. *Magonia pubescens* (Sapindaceae) seed oil: physical and chemical properties, fatty acid profile and biodiesel production. *J Agric Sci.* 2017;9(10):178.
136. Karunasingha DSK. Root mean square error or mean absolute error? Use their ratio as well. *Inf Sci (Ny).* 2022;585:609–29.
137. Braga JWB, Poppi RJ. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. *Quim Nova.* 2004;27(6):1004–11.
138. Silva SG, Rocha FRP. A flow injection procedure based on solenoid micro-pumps for spectrophotometric determination of free glycerol in biodiesel. *Talanta.* 2010;83(2):559–64.
139. Sako AVF, Micke GA. Fast determination of iodine number of biodiesel using capillary zone electrophoresis with multi-and single-point calibration. *J Braz Chem Soc.* 2019;30(2):318–25.
140. Spudeit DA, Piovezan M, Dolzan MD, Vistuba JP, Azevedo MS, Vitali L, et al. Simultaneous determination of free and total glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis using multiple short-end injection. *Electrophoresis.* 2013;34(24):3333–40.
141. Eggly GM, Blackhall M, de Araújo Gomes A, Santos R, de Araújo MCU, Pistonesi MF. Emitter/receiver piezoelectric films coupled to flow-batch analyzer for acoustic determination of free glycerol in biodiesel without chemicals/external pretreatment. *Microchem J.* 2018;138:296–302.
142. Pereira AC, Rocha FRP. Liquid–liquid microextraction in a multicommuted flow system for direct spectrophotometric determination of iodine value in biodiesel. *Anal Chim Acta.* 2014;829:28–32.
143. ASTM D6584, Test method for determination of free and total glycerin in B100 biodiesel methyl esters by gas chromatography. 2004;

144. Klasner SA, Price AK, Hoeman KW, Wilson RS, Bell KJ, Culbertson CT. Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(5):1821–9.
145. Ariza-Avidad M, Agudo-Acemel M, Salinas-Castillo A, Capitán-Vallvey LF. Inkjet-printed disposable metal complexing indicator-displacement assay for sulphide determination in water. *Anal Chim Acta.* 2015;872:55–62.
146. Morosanova MA, Bashkatova AS, Morosanova EI. Spectrophotometric and smartphone-assisted determination of phenolic Compounds using crude eggplant extract. *Molecules.* 2019;24(23):4407.
147. Oliveira KA, Damasceno D, Oliveira CR, Silveira LA, Oliveira AE, Coltro WKT. Dengue diagnosis on laser printed microzones using smartphone-based detection and multivariate image analysis. *Anal Methods.* 2016;8(35):6506–11.
148. A. D. McNaught, A. Wilkinson, editors. IUPAC, Compendium of Chemical Terminology. 2nd ed. Vol. Gold Book. 1997.
149. Introdução do biodiesel na matriz energética brasileira - Lei Nº 11.097 [Internet]. Available from: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11097.htm
150. Kumar NV, Chauhan SR. Performance and emission characteristics of biodiesel from different origins: A review. *Renew Sustain Energy Rev.* 2013;21:633–58.
151. Silva MAA, Correa RA, Tavares MGO, Antoniosi Filho NR. A new spectrophotometric method for determination of biodiesel content in biodiesel/diesel blends. *Fuel.* 2015;143:16–20.
152. Scherer MD, Oliveira SL, Lima SM, Andrade LHC, Caires ARL. Determination of the biodiesel content in diesel/biodiesel blends: a method based on fluorescence spectroscopy. *J Fluoresc.* 2011;21(3):1027–31.
153. Foglia TA, Jones KC, Phillips JG. Determination of biodiesel and triacylglycerols in diesel fuel by LC. *Chromatographia.* 2005;62(3–4):115–9.
154. Máquina ADV, Siteo BV, Buiatte JE, Santos DQ, Neto WB. Quantification and classification of cotton biodiesel content in diesel blends, using mid-infrared spectroscopy and chemometric methods. *Fuel.* 2019;237:373–9.
155. Mahmodi K, Mostafaei M, Mirzaee-Ghaleh E. Detection and classification of diesel-biodiesel blends by LDA, QDA and SVM approaches using an electronic nose. *Fuel.* 2019;258:116114.
156. US 7,927,877 B1, Detection and analysis of biodiesel in fuels. 2011;

157. Silva LR, Ferreira MMC. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. *Quim Nova*. 2003;26(3):312–8.
158. Pub Chem - National center for biotechnology information - methyl linoleate [Internet]. [cited 2021 Oct 1]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284421#section=LogP>
159. Pub Chem - National center for biotechnology information - linoleic acid [Internet]. [cited 2021 Feb 1]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280450#section=LogP>
160. Mayo CM, Alayón AB, Rodríguez MTG, Abizanda AIJ, Moreno FJ. Green chromatography determination of fatty acid methyl esters in biodiesel. *Environ Technol*. 2015;36(15):1933–42.
161. Pardo VL, Fagundes CAM, Caldas SS, Kurz MH, Clementin RM, D'Oca MGM, et al. Development and validation of a method for the determination of fatty acid methyl ester contents in tung biodiesel and blends. *J Am Oil Chem Soc*. 2012;89(4):631–7.
162. Sitko R, Zawisza B, Kowalewska Z, Kocot K, Polowniak M. Fast and simple method for determination of fatty acid methyl esters (FAME) in biodiesel blends using X-ray spectrometry. *Talanta*. 2011;85(4):2000–6.
163. Paiva EM, Rohwedder JJR, Pasquini C, Pimentel MF, Pereira CF. Quantification of biodiesel and adulteration with vegetable oils in diesel/biodiesel blends using portable near-infrared spectrometer. *Fuel*. 2015 Nov;160:57–63.
164. Oliveira FCC, Brandão CRR, Ramalho HF, Costa LAF, Suarez PAZ, Rubim JC. Adulteration of diesel/biodiesel blends by vegetable oil as determined by Fourier transform (FT) near infrared spectrometry and FT-Raman spectroscopy. *Anal Chim Acta*. 2007;587(2):194–9.
165. Merenda F, Bühler S, Farah H, Boer G, Scharf T. Portable NIR/MIR Fourier-transform spectrometer based on a common path lamellar grating interferometer. Druy MA, Brown CD, Crocombe RA, editors. *ProcSPIE*. 2010;7680:76800V.
166. Costa RPM, Khalila TC, Santos APF, Andrade DF, D'Avila LA. Determination of biodiesel content in diesel using the colorimetric assay for hydroxamic acid. *Quim Nova*. 2015;38(4):563–9.
167. Convery N, Gadegaard N. 30 years of microfluidics. *Micro Nano Eng*. 2019;2:76–91.

168. Niculescu A-G, Chircov C, Bîrcă AC, Grumezescu AM. Fabrication and applications of microfluidic devices: a review. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 18;22(4):1–26.
169. Gomez IO, Muñoz MO, Sánchez AM, Payá IO, Mateo FH, Vallvey LFC, et al. A vinyl sulfone clicked carbon dot-engineered microfluidic paper-based analytical device for fluorometric determination of biothiols. *Microchim Acta.* 2020;187(7):421.
170. Erenas MM, Carrillo-Aguilera B, Cantrell K, Gonzalez-Chocano S, P. Vargas-Sansalvador IM, Orbe-Payá I, et al. Real time monitoring of glucose in whole blood by smartphone. *Biosens Bioelectron.* 2019;136:47–52.
171. Gómez IO, Castillo AS, García AG, Bermejo JAA, Payá IO, Diéguez AR, et al. Microfluidic paper-based device for colorimetric determination of glucose based on a metal-organic framework acting as peroxidase mimetic. *Microchim Acta.* 2018;185(47):1–8.
172. Franco MOK, Suarez WT, Santos VB, Resque IS, Santos MH, Capitán-Vallvey LF. Microanalysis based on paper device functionalized with cuprizone to determine Cu²⁺ in sugar cane spirits using a smartphone. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2021;253.
173. Suarez WT, Franco MOK, Vallvey LFC, Erenas MM. Chitosan-modified cotton thread for the preconcentration and colorimetric trace determination of Co(II). *Microchem J.* 2020;158:105137.
174. Zawadzki A, Shrestha DS, He B. Biodiesel blend level detection using ultraviolet absorption spectra. *Trans ASABE.* 2007;50(4):1349–53.