UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

SAMARA SOARES

Desenvolvimento de procedimentos analíticos rápidos para o controle de qualidade de biodiesel

Piracicaba

2018

SAMARA SOARES

Desenvolvimento de procedimentos analíticos rápidos para o controle de qualidade de biodiesel

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

Piracicaba 2018 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

Desenvolvimento de procedimentos analíticos rápidos 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, 2018.

86 p. : il.

Dissertação (Mestrado – 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. Análise em fluxo 2. Biocombustíveis 3. Espectrofotometria 4. Imagem digital 5. Química ambiental 6. Química verde I. Título

CDU (543.06 + 543.422.3) : 62-68

Elaborada por: Marilia Ribeiro Garcia Henyei CRB-8/3631 Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Dedico este trabalho a minha mãe (Marli), avó (Vicentina) e aos meus irmãos (Kayalla e Rodrigo) por sempre acreditarem nos meus ideais, torcendo e dando base para que eu os alcance. Ao meu pai José Lazaro, que já não está mais neste plano, mas que sempre está presente em minha memória nas decisões mais importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por orientar meu caminho e por me dar forças para realizar mais uma etapa na minha vida.

Em especial ao meu orientador, Prof. Fábio Rocha, por sempre acreditar em mim, pela confiança e por todos os ensinamentos, que serei eternamente grata. "Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção." (Paulo Freire)

À minha Família, por estarem sempre presentes e me motivarem com muito amor a alçar voos cada vez mais altos.

Ao Cesar pelo apoio e incentivo durante esses anos.

À Professora Wanessa e aos meus amigos Lidiane e Manoel pelos trabalhos realizados em conjunto.

Aos colegas do grupo: Anna Flávia, Carina, Mariana, Milton, Pedro, Sol e Thiago pelas conversas Científicas ou de descontração.

À Ticiane, que se tornou muito importante durante toda essa caminhada.

Às técnicas (Sheila (aos chocolates), Fátima (aos bolos), Liz) e à secretária (Cláudia) do Laboratório de Química Analítica "Henrique Bergamim Filho" por sempre estarem cuidando de mim.

Ao Prof. Chico que sempre me incentivou e acreditou no meu potencial.

Aos Professores, Thiago, Jarbas e Wanessa pelas sugestões no exame de qualificação.

A todos os colegas da Química Analítica, aos que ainda estão e aos que já passaram por aqui, pelos bons momentos de descontração.

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

Ao Milton pelas correções e sugestões na redação da dissertação.

Ao Professor Leonardo S. G. Teixeira (UFBA) pelas análises do teor de éster pelo método oficial.

As usinas produtoras de biodiesel pelo fornecimento das amostras de biodiesel.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2016/00138-0, pela concessão da bolsa.

Muito obrigada a todos!

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."

Marie Curie

RESUMO

SOARES, S. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos rápidos para o controle de qualidade de biodiesel**. 2018. 86 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

A presente dissertação apresenta os resultados referentes ao desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação de índice de iodo em biodiesel e óleo vegetal e do teor de éster em biodiesel e em misturas biodiesel: diesel. O primeiro procedimento para a determinação de índice de iodo foi baseado na descoloração de uma solução de I_3 monitorada por espectrofotometria. Para amostras de biodiesel e óleo vegetal, foram obtidas respostas lineares nos intervalos de 10-106 g $I_2/100$ g e 20-144 g $I_2/100$ g, respectivamente. O coeficiente de variação (n = 10) e o limite de detecção (99,7% nível de confiança) foram estimados em 5,0% e 2,5 g $I_2/100$ g para amostras de biodiesel, enquanto para amostras de óleos vegetais os valores foram 3,0% e 7 g l₂/100 g, respectivamente. Foram consumidos ca. 1,2 mL de amostra, 0,365 mg de I_2 e 40 mg de KI, e gerado *ca.* 2,2 mL de resíduo por determinação. Efeitos de matriz foram constatados e superados por calibração com compatibilização de matriz. Alternativamente, foi desenvolvimento um spot test utilizando imagens digitais, também baseado no consumo de l₂ pelos compostos insaturados presentes na amostra, porém envolvendo a deposição de alíquotas de reagente em papel de filtro e a medida do l₂ remanescente, na forma do complexo com amido. As medidas foram realizadas com a câmera de um celular e tratadas como reflectância. Resposta linear foi obtida entre 10-106 g l₂/100 g de biodiesel, com coeficiente de variação (n = 10) e limite de detecção (99,7% nível de confiança) estimados em 5,0% e 8 g l₂/100 g, respectivamente. Foram consumidos 40 µL de amostra e 50 µg de l₂ e gerado 65 µL de resíduo por determinação. A determinação do teor de éster baseou-se na formação do complexo violeta entre Fe(III) e hidroxamato, gerado pela reação entre os ésteres de alguila da amostra e hidroxilamina. Foi utilizado um sistema de análises de fluxo, explorando o processo lab-in-syringe, com etanol como solvente mediador para gerar uma única fase entre a amostra hidrofóbica e os reagentes hidrofílicos. Respostas lineares foram obtidas nos intervalos 4-99% (v/v) e 2-40% (v/v) para biodiesel e mistura biodiesel: diesel. respectivamente. Para as amostras de biodiesel, o coeficiente de variação, o limite de deteccão e a frequência de amostragem foram estimados em 0,80% (n = 10), 0,36% e 15 h⁻¹, respectivamente, enquanto para a mistura biodiesel:diesel foram 0,20%, 0,03% (v/v) e 12 h⁻¹, respectivamente. Foram consumidos 40 μ L de amostra de biodiesel e 100 µL da mistura biodiesel:diesel, 0,860 mg de hidroxilamina, 0,145 mg Fe e gerado ca. 3 mL de resíduo. Os resultados obtidos em todos os procedimentos foram concordantes com os obtidos em procedimentos de referência com 95% de confiança. Os procedimentos desenvolvidos são práticos e viáveis para análises on-line e at-line, além de consumirem pequenas quantidades de solventes orgânicos e reagentes e gerarem pequenos volumes de resíduos.

Palavras-chave: Biodiesel. Índice de iodo. Teor de éster. Química analítica limpa.

ABSTRACT

SOARES, S. **Fast analytical procedures for biodiesel quality control**. 2018. 86 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

The present dissertation is focused on the development of analytical procedures for the determination of iodine value in biodiesel and vegetable oils as well as of ester content in biodiesel and biodiesel: diesel blends. The procedure for the determination of jodine value was based on discoloration of a trijodide solution measured by spectrophotometry. For biodiesel and vegetable oil samples, linear responses were obtained from 10-106 g $I_2/100$ g and 20-144 g $I_2/100$ g, respectively. The coefficient of variation (n = 10) and limit of detection (99.7% confidence level) were 5.0% and 2.5 g $l_2/100$ g, whereas for vegetable oils, the values were 3.0% and 7 g $l_2/100$ g, respectively. About 1.2 mL of sample, 0.365 mg of I₂ and 40 mg of KI were consumed per determination, with generation of ca. 2.2 mL of waste. Matrix effects were circumvented by matrix matching. Alternatively, a spot test using digital images was developed, also based on consumption of iodine by unsaturated compounds in the samples, but relying on deposition of reagent aliquots on a filter paper followed by measurement of remaining iodine, through its complex formed with starch. The measurements were performed with a cell phone camera and treated as reflectance. A linear response was obtained within 10 and 106 g l₂/100 g of biodiesel. The coefficient of variation (n = 10) and limit of detection were (99.7% confidence level) estimated at 4.9% and 8 g l₂/100 g, respectively. About 40 µL of sample and 50 µg of I_2 were consumed per determination, with generation of ca. 65 μ L of waste per determination. Ester determination was based on reaction of alkyl esters from biodiesel and hydroxylamine, yielding hydroxamate, which was measured by spectrophotometry as an iron(III) complex. The flow-based procedure exploited the lab-in-syringe approach, by using ethanol as mediator solvent to generate a single phase between the hydrophobic sample and the hydrophilic reagents. Linear responses were obtained from 4 to 99% (v/v) and 2 to 40% (v/v) for biodiesel and biodiesel:diesel blends, respectively. For biodiesel samples the coefficient of variation (n = 10), detection limit (99.7% confidence level) and sampling rate were estimated at 0.80%, 0.36%, and 15 h^{-1} , respectively, whereas for biodiesel:diesel blends, the corresponding values were 0.20%, 0.03% (v/v), and 12 h^{-1} , respectively. About 40 µL of biodiesel or 100 µL biodiesel:diesel blends, 0.860 mg of hydroxylamine, and 0.145 mg Fe were consumed per determination, with generation of ca. 3 mL of waste. The results obtained by all the proposed procedures agreed with the reference ones at the 95% confidence level. The proposed procedures are practical and feasible for on-line or at-line analysis, by consuming only low amounts of organic solvents and reagents, and generating low waste volumes.

Keywords: Biodiesel. lodine value. Ester content. Green analytical chemistry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de qualidade do biodiesel e efeitos de valores não conformes 25
Tabela 2: Índices de iodo das amostras de biodiesel analisadas pelos procedimentos proposto e de referência
Tabela 3: Índices de iodo das amostras de óleo vegetal refinado e degomado determinados pelos procedimentos proposto e de referência
Tabela 4: Planejamento fatorial 2 ³ para a avaliação de robustez do procedimento52
Tabela 5: Índices de iodo determinados pelos procedimentos proposto e o de referência
Tabela 6: Principais características dos procedimentos para a determinação de índice de iodo em biodiesel e óleo vegetal56
Tabela 7: Rotina analítica do sistema SIA para a quantificação do teor éster em biodiesel
Tabela 8: Rotina analítica do sistema SIA para a quantificação de biodiesel na mistura biodiesel:diesel
Tabela 9: Teores de éster das amostras de biodiesel analisadas pelos procedimentos proposto e de referência76
Tabela 10: Teores de biodiesel na mistura biodiesel:diesel determinados pelos procedimentos proposto e de referência76
Tabela 11: Características analíticas dos procedimentos para a determinação do teor
de éster em biodiesel puro e na mistura com o diesel

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática do procedimento para a determinação de
índice de iodo em biodiesel e óleos vegetais
Figura 2- Diagrama esquemático do <i>spot test</i> para a determinação do índice de iodo em biodiesel
Figura 3- Espectro de absorção de uma solução de 86 mmol $L^{-1} I_3^{-1}$
Figura 4- Efeito da concentração de l ₂ sobre os sinais de referência e analítico .
Figura 5- Efeito da concentração de KI sobre os sinais de referência e analítico 41
Figura 6- Efeito do tempo de reação dos compostos insaturados com o I_2 42
Figura 7- Efeito do tempo de reação dos compostos insaturados com o I_2 sobre os sinais de referência e analítico
Figura 8- Espectro de absorção de diferentes misturas (biodiesel + hexano; biodiesel + hexano + I ₂ ; biodiesel + hexano + I ₂ + amido)
Figura 9- Efeito da concentração de I_2 sobre os sinais analítico e de referência. 49
Figura 10- Efeito do volume de biodiesel sobre os sinais analítico e de referência
Figura 11- Gráfico de pareto com os efeitos das principais variáveis e suas interações para a avaliação de robustez
Figura 12- Diagrama de fluxo do sistema lab-in-syringe para a determinação do teor
de éster em biodiesel e na mistura com o diesel64
Figura 13- Espectro de absorção do complexo Fe(III)/hidroxamato67
Figura 14- Efeito do volume de solução de hidroxilamina sobre os sinais analítico e
do branco

Figura 15- Efeito do volume de solução de NaOH sobre os sinais analítico e do
branco70
Figura 16- Efeito do volume de solução de Fe(III) em HNO ₃ sobre os sinais analítico
e do branco71
Figura 17- Efeito do volume de biodiesel sobre os sinais analítico e do branco
Figura 18- Efeito do tempo de reação entre os ésteres metílicos e a hidroxilamina
sobre os sinais analítico e do branco73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – amostra

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

CV – Coeficiente de variação

D – detector

d.i. – diâmetro interno

FAME – Ésteres metílicos de ácidos graxos, do inglês Fatty Acid Methyl Esters

FIA – Análise por injeção em fluxo, do inglês Flow Injection Analysis

GC-FID – Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama, do inglês Gas Chromatography with Flame Ionization Detector

GC-MS – Cromatografia gasosa - espectrometria de massas, do inglês Gas Chromatography- Mass Spectrometry

H NMR – Ressonância magnética nuclear, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*

HPLC-UV – Cromatografia líquida alto desempenho detecção de com espectrofotométrica no ultravioleta, do inglês High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection

MV – Válvula de multiposição, do inglês *Multiposition Valve*

NIR – Espectroscopia na região do infravermelho próximo, do inglês Near Infrared Spectroscopy

- RGB Vermelho, verde e azul, do inglês Red-Green-Blue
- SIA Análise por injeção sequencial, do inglês Sequential Injection Analysis

SP – Bomba tipo seringa, do inglês Syringe Pump

V – Válvula solenoide de três vias, do inglês Three-way solenoid valve

W – Resíduo, do inglês Waste

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Biodiesel	21
1.1.1.Controle de qualidade de biodiesel	23
1.2.Análises <i>in situ</i>	26
2. OBJETIVOS	29
3. Determinação de índice de iodo em biodiesel e óleo vegetal	31
Resumo	31
Abstract	32
3.1. Introdução	31
3.2. Parte experimental	34
3.2.1.Procedimento em frasco único	34
3.2.1.1.Equipamentos e acessórios	34
3.2.1.2.Reagentes e soluções	34
3.2.1.3.Procedimento	35
3.2.2.Spot test	36
3.2.2.1.Equipamentos e acessórios	36
3.2.2.Reagentes e soluções	36
3.2.2.3.Procedimento	37
3.3. Resultados e Discussão	37
3.3.1.Procedimento em frasco único	37
3.3.1.1.Aspectos gerais	37
3.3.1.2.Otimização (determinação de índice de iodo em biodiesel)	39
3.3.1.3.Otimização (determinação de índice de iode em óleos vegetais)	42
3.3.1.4.Características analíticas	44

3.3.2.Spot test para a determinação de índice de iodo	46
3.3.2.1.Aspectos gerais	46
3.3.2.2.Otimização	48
3.3.2.3.Avaliação de robustez	51
3.3.2.4.Características analíticas	53
3.3.2.5.Comparação dos procedimentos para determinação de índice de iodo biodiesel e óleo vegetal	em 55
3.4. Conclusões	53
4. Determinaçâo do teor de éster em biodiesel e em mistura biodiesel:die	e sel 59
Resumo	59
Abstract	60
4.1. Introdução	61
4.2. Parte experimental	62
4.2.1.Equipamentos e acessórios	62
4.2.2.Reagentes e soluções	62
4.2.3.Procedimento	63
4.3. Resultados e Discussão	66
4.3.1.Aspectos gerais	66
4.3.2.Otimização (procedimento para a determinação de éster em biodiesel)	68
4.3.3.Otimização (procedimento para a determinação de biodiesel na mistura biodiesel:diesel)	73
4.3.4.Características analíticas	74
4.4. Conclusões	79
Referências	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biodiesel

Devido à crescente demanda, vem se tornando necessária a busca por combustíveis alternativos e mais limpos do que os de origem fóssil. Diante disso, o biodiesel, proveniente de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais, tem sido gradualmente introduzido na matriz energética brasileira. Além da importância estratégica e econômica, esse biocombustível é ambientalmente mais amigável, por reduzir significativamente a emissão de gases poluentes, pelo consumo de CO₂ devido à realização da fotossíntese pelas oleaginosas (matéria-prima), um dos principais gases tóxicos emitidos pelos combustíveis de origem não renovável [1].

O uso de óleos vegetais como combustíveis foi proposto no Brasil em 1975, quando foi instituído o programa Pró-óleo (Plano de produção de óleos vegetais para fins energéticos). Seu objetivo era desenvolver um biocombustível proveniente de óleos vegetais capaz de competir com os custos de produção dos combustíveis derivados do petróleo. Porém, os resultados não foram positivos e a pesquisa foi interrompida. Em 1983, o governo brasileiro, motivado pela alta nos preços do petróleo, retornou a pesquisa para o desenvolvimento de combustíveis derivados de óleos vegetais, lançando o Programa de Óleos Vegetais (OVEG), no qual foi avaliada a utilização de biodiesel como combustível. Apesar de ter sido constatada a viabilidade técnica da utilização do biocombustível, os elevados custos de produção em relação ao óleo diesel, impediram seu uso em escala comercial [2].

Em 2003, retornaram se os estudos para otimizar a produção do biodiesel. Foi então instituída a política do biodiesel no Brasil e, em dezembro de 2004, o governo federal lançou o Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB). O objetivo, na etapa inicial, foi introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira, com enfoque na inclusão social, conservação do meio ambiente e desenvolvimento regional. A mistura de biodiesel ao diesel fóssil foi autorizada em dezembro de 2004. Em janeiro de 2008, tornou-se obrigatória a mistura de 2% (v/v) de biodiesel ao diesel em todo o território nacional. Esse percentual tem sido ampliado pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), chegando a 5% (v/v) em janeiro de 2010 e 8% (v/v) em 2017. Recentemente, foi autorizada a adição de 10% (v/v) em 2018 [3,4].

O biodiesel é composto por ésteres alquilícos, usualmente produzidos pela reação de transesterificação de triglicerídeos (espécies características dos óleos vegetais e gordura animal), com etanol ou metanol, na presença de um catalisador (uma base ou ácido), gerando como subproduto glicerol (Equação 1) [2]. Após a reação, o glicerol e uma parte do álcool são removidos do biodiesel por lavagem com água. A separação do glicerol é facilitada pela alta solubilidade em água, sendo conduzida em decantadores ou em centrífugas. O álcool residual é então removido por evaporação. Logo após, é necessário adicionar um ácido ou base para neutralizar qualquer catalisador residual [5].



A produção de biodiesel no Brasil alcançou aproximadamente 4 milhões de m³ em 2016. A principal matéria-prima utilizada tem sido de óleo de soja (*ca.* 70%), seguida de gordura animal (*ca.* 16%) e de outros tipos de óleos vegetais, como os de algodão, palma, dendê e de fritura (*ca.* 14%). A região Norte é a que mais utiliza óleos de palma e dendê como matéria-prima para produção de biodiesel. O uso de óleo de soja é característico da região Centro Oeste. Já as regiões Nordeste, Sudeste e Sul usam uma variedade de matérias-primas, como óleo de soja, algodão, palma, dendê e de fritura, além de gordura bovina, de frango e de porco. Essa variedade de matérias-primas aumenta a complexidade do biodiesel em relação a diferentes tipos de éster presentes [6].

O biodiesel é vendido em leilões e, em 2017, o valor do m³ chegou a R\$ 2,4 reais/L, *ca.* 15% inferior que no mesmo período de 2016 [7]. O Brasil é o segundo maior produtor e consumidor mundial de biodiesel, com volumes inferiores somente aos dos Estados Unidos [8]. Esse destaque deve-se ao país ser um dos maiores produtores mundiais de óleo de soja, possuir regiões com diferentes climas, o que favorece o plantio de diversas oleaginosas, bem como possuir uma área significativa de terras férteis destinadas à agricultura [8,9].

1.1.1. Controle de qualidade de biodiesel

As estruturas moleculares dos ésteres constituintes, a presença de contaminantes oriundos das matérias-primas, a transesterificação incompleta e a estocagem inadequada afetam a qualidade do biodiesel. O controle de qualidade do biodiesel tem por objetivo avaliar estes aspectos e também evitar fraudes, como a adição ilegal de solventes de baixo custo ao combustível, assegurando os direitos dos consumidores. Também visa evitar que, devido ao não atendimento às especificações, o biodiesel danifique partes dos motores, por entupimento de bicos injetores ou corrosão, assim como a formação de substâncias tóxicas durante a combustão, como a acroleína. Alguns dos principais parâmetros de qualidade de biodiesel são listados na Tabela 1 [5].

Os métodos analíticos para a avaliação da qualidade do biodiesel podem ser divididos em quatro grupos: 1) avaliação de contaminantes provenientes da matériaprima, incluindo a determinação de fósforo e enxofre; 2) avaliação do processo produtivo, que inclui a quantificação de sódio, potássio, cinzas sulfatadas e do teor de éster; 3) avaliação das propriedades inerentes às estruturas moleculares, que inclui a medida da viscosidade cinemática e do índice de iodo; 4) monitoramento do biodiesel durante a estocagem, que engloba a determinação do índice de acidez e estimativa da estabilidade oxidativa [5].

No Brasil, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) estabeleceu um padrão de qualidade para o biodiesel que segue especificações rigorosas e normas consideram as características da matéria-prima, o produto final e as condições de transporte e estocagem. Os laboratórios para análise da qualidade do biodiesel são credenciados e inspecionados pela ANP, e seguem métodos estabelecidos pelas normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), como também pelas normas internacionais da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *International Organization for Standardization* (ISO) e *Comité Européen de Normalisation* (CEN). Por exemplo, cromatografia gasosa e líquida é recomendada para a determinação de glicerina livre, teor de éster e metanol, e titulação volumétrica para determinação de índice de iodo e acidez [5].

Alguns dos métodos oficiais utilizam equipamentos caros ou são morosos e requerem o uso de solventes tóxicos [5]. Diante disso, é necessário o desenvolvimento de procedimentos alternativos para o controle de qualidade do biodiesel, que sejam mais rápidos e utilizem reagentes e solventes menos tóxicos, bem como consumam menores quantidades dos mesmos [10].

 Tabela 1- Parâmetros de qualidade do biodiesel e efeitos de valores não conformes [5]

Parâmetro	O que expressa	Efeito de valores não conformes	Limite-ANP
Viscosidade cinemática (40 °C)	Resistência ao fluxo sob gravidade	Funcionamento inadequado dos sistemas de injeção	1,9 – 6,0 (mm²/s)
Água e sedimentos	Excesso de água no biocombustível	Reações com ésteres, crescimento microbiano e formação de sabão	0,05% (v/v)
Teor de éster	Eficiência da reação de transesterificação	Redução de eficiência energética do biocombustível	96,5% (m/m)
Resíduo de carbono	Resíduo após combustão no motor	Entupimento dos injetores	0,05% (m/m)
Cinzas sulfatadas	Teor de resíduos minerais	Danos ao motor (corrosão)	0,02% (m/m)
Índice de iodo	Grau de insaturação dos ésteres	Oxidação do biodiesel	Não estabelecido: Anotar g l₂/100 g
Na, K, Ca e Mg	Resíduos de catalisador e metais de óleos usados	Danos ao motor e entupimento dos bicos injetores	10 (mg/kg)
Índice de acidez	Presença de ácidos graxos livres e água	Corrosão do motor e tanques de armazenamento	0,5 g KOH/g
Glicerina livre	Separação incompleta da glicerina após transesterificação	Depósitos de carbono no motor e geração de substâncias tóxicas	0,02% (m/m)
Glicerina total	Soma da glicerina livre e da glicerina combinada, resultado da transesterificação incompleta	Depósitos de carbono no motor	0,25% (m/m)
Mono, di e triacilglicerídios	Transesterificação incompleta	Depósitos de carbono no motor e formação de sabão	Anotar: % (m/m)
Estabilidade oxidativa (110 °C)	Degradação ao longo do tempo	Aumento de acidez, corrosão e formação de resíduos	6 h

1.2. Análises in situ

As análises *in situ* (*i.e.* no próprio local em que há a demanda analítica) são atrativas devido à possibilidade de tomadas de decisões rápidas, mediante respostas analíticas quase que imediatas, quando comparadas com algumas análises realizadas em laboratório. Essas análises são classificadas em relação ao tipo de amostragem e posição do equipamento: 1) *in-line*, quando o sistema de detecção é inserido na linha de processo; 2) *on-line*, quando a amostragem é automatizada e incorporada à produção, e a análise é realizada externamente à linha de processo; 3) *at-line*, que envolve a amostragem manual e análise com equipamento portátil [11,12]. Vários equipamentos analíticos atendem aos requisitos para análises *in situ*, incluindo portabilidade e baixo consumo de energia e de suprimentos, como reagentes e solventes [13-15]. Em relação ao monitoramento do processo de produção de biodiesel, espectrofotômetros UV-Vis [16], cromatógrafos a gás [17-19] e a líquido [20] e espectroscopia no infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared spectroscopy*) [21] já foram utilizados para análises *in situ*.

Análises *in situ* requerem procedimentos mais simples e rápidos, envolvendo menor número de etapas e de reagentes e o uso de equipamentos e aceessórios de fácil acesso e portáteis. Nesse sentido, procedimentos em frasco único são bastante atraentes para o monitoramento (*on-line* ou *at-line*) dos parâmetros de qualidade de biodiesel, tal como demonstrado na determinação de glicerol [22]. A utilização de frasco único permite que todas as etapas de preparo de amostra, tais como pesagem, diluição e derivação química sejam feitas no mesmo frasco em que é realizada a determinação do analito, proporcionando vantagens em relação ao tempo de análise, à menor manipulação da amostra e aos menores riscos de contaminação [23-25].

Também são adequados para as análises *in situ* os sistemas de análises em fluxo, nos quais as várias etapas envolvidas nas análises químicas, como a tomada de alíquotas de amostras e reagentes, diluições, reações e separações são conduzidas de forma altamente reprodutível em termos de condições de mistura, reacionais e de temporização [26]. Diante dessas características, as análises em fluxo são adequadas para a rápida determinação de parâmetros de qualidade. Particularmente, em análises envolvendo sistemas bifásicos (*e.g.* biodiesel e

reagentes aquosos), diversas alternativas são disponíveis, permitindo a exploração analítica mesmo de extrações e de reações incompletas [27].

A análise por injeção sequencial (SIA, do inglês Sequential Injection Analysis) foi desenvolvida para aumentar a robustez e versatilidade de sistemas de análises em fluxo e facilitar o monitoramento on-line em processos industriais [28]. Um sistema SIA é composto por uma bomba tipo seringa (ou, alternativamente, por uma bomba peristáltica) bidirecional, de uma válvula seletora, com seis a dez vias para entrada ou saída de fluidos, de tubulações utilizadas para reações e extrações, de linhas de transmissão e do sistema de detecção [29]. A bomba propulsora e a válvula seletora são controladas por um microcomputador, de forma que as alíquotas dos diferentes fluídos (e.g. amostra, reagentes е solventes) são amostradas por tempo, de forma bastante reprodutível e com vazões que podem ser programadas dependendo da necessidade [30]. Essas alíquotas são geralmente armazenadas em uma bobina coletora e, posteriormente, encaminhadas para um reator, revertendo-se o sentido do fluxo. Por se tratar de um sistema em linha única, a mistura ocorre exclusivamente por dispersão nas interfaces [31], o que consiste em uma limitação desse processo [32].

O sistema *lab-in-syringe* deriva-se do SIA, baseado em princípios análogos aos do sistema em frasco único, onde todas as etapas de processamento da amostra são realizadas dentro de uma seringa, que também atua como propulsor de fluídos [33,34]. Trata-se, portanto, de uma variante de sistema fluxo-batelada [34]. Para implementar o processo *lab-in-syringe*, a seringa é acoplada diretamente à válvula seletora, permitindo a amostragem sequencial dos diferentes fluidos. A estratégia tem sido utilizada com sucesso em diversas aplicações analíticas, com destaque para extrações líquido-líquido em fluxo, especialmente por promover maior interação entre amostra e extrator. Aplicações recentes incluem microextração líquido-líquido dispersiva [33] e em ponto nuvem [34]. Esse processo tem grande potencial para análises *in situ (on-line*), incluindo a determinação de parâmetros de qualidade de biodiesel.

Spot tests são procedimentos analíticos que consomem pequenas quantidades de reagentes e solventes e também possibilitam análises *in situ,* por serem executados em poucas etapas [35]. Como consequência, tem-se baixa geração de resíduos e a rápida obtenção de resultados visando, por exemplo, a rápida tomada de decisões e/ou medidas corretivas. [36]. Spot tests têm sido

bastante utilizados para análises qualitativas e quantitativas de compostos inorgânicos [36] e orgânicos [37], para análise de fármacos [38], de peixes [39], de bebidas [40], de águas [41]. Essa estratégia também tem sido utilizada na área da saúde [42,43] e para controle de atividade enzimática [44]. *Spot tests* geralmente exploram reações colorimétricas e, para fins quantitativos, as medidas têm sido usualmente realizadas por reflectância [38]. Mais recentemente, têm sido propostos procedimentos utilizando imagens digitais obtidas por meio de *scanners* [45-47] ou câmeras de telefone celulares [48-50]. No caso do uso de imagens digitais, têm sido utilizados aplicativos que fazem a conversão dessas imagens em dados numéricos, usualmente em valores de RGB (do inglês *red-green-blue*) [51].

O uso de telefones celulares para realização das análises *in situ* vem ganhando interesse na indústria e no meio científico, especialmente porque os celulares são amplamente disponíveis e o desempenho em muitos casos é comparável ao obtido com espectrofotômetros. Inicialmente, esse processo era dividido em registro da imagem (foto) tirada por uma câmera e a digitalização da mesma em um scanner para a interpretação dos dados, utilizando *softwares* específicos. Atualmente, predomina o uso de câmeras de telefone celular para captura das imagens referentes às cores geradas nas reações colorimétricas e aplicativos para transformar essas imagens em valores de RGB. Os valores de RGB são combinações das cores vermelho, verde e azul, de modo a reproduzir o espectro de cores na região visível [51]. Procedimentos *spot test* utilizando medidas com a câmera de telefones celulares são disponíveis em algumas áreas, como para a determinação de furfural, um subproduto do processo de fermentação na produção de bebidas [40], mas não foi encontrado nenhum *spot test* para controle de qualidade de biodiesel, apesar do grande potencial essa aplicação.

2. OBJETIVOS

Visando simplificar e tornar mais ambientalmente amigável a determinação de alguns dos parâmetros de qualidade de biodiesel, o objetivo geral desta dissertação foi o desenvolvimento de procedimentos analíticos que consumam pequenas quantidades de reagentes e que permitam a rápida obtenção de resultados. Os objetivos específicos foram: (i) o desenvolvimento de procedimentos em frasco único e *spot test* para a determinação de índice de iodo em biodiesel e óleos vegetais e (ii) o desenvolvimento de um procedimento em fluxo, explorando a estratégia *lab-in-syringe,* para quantificar o teor de éster em biodiesel e a porcentagem de biodiesel na mistura com diesel.

3. Determinação de índice de iodo em biodiesel e óleo vegetal^{1,2}

Resumo

O índice de iodo é um importante parâmetro de qualidade de biodiesel e de óleos vegetais, pois está diretamente relacionado ao grau de insaturação dos triglicerídeos e ésteres de alquila e, portanto, à estabilidade oxidativa dos produtos. Valores não conformes em biodiesel podem resultar na corrosão e entupimento de partes dos motores. Em óleos, o monitoramento é importante para avaliar a degradação do produto, assegurando o odor e sabor característicos do óleo. Neste contexto, essa etapa da dissertação objetivou o desenvolvimento de procedimentos baseado em frasco único para a determinação de índice de iodo em biodiesel e óleo vegetal e de um spot test para a determinação de índice de iodo em biodiesel. Ambos os procedimentos foram baseados na dissolução de l₂ nas amostras (a partir de uma solução aquosa de I_3^- ou de uma solução etanólica de I_2) e medida indireta do consumo do reagente devido à halogenação dos compostos insaturados. O procedimento em frasco único foi baseado na descoloração de uma solução aquosa de l₃, sendo a fração remanescente, quantificada por espectrofotometria (450 nm) na fase aquosa. No spot test, o l₂ remanescente foi determinado após a formação do complexo com o amido na superfície de um papel evitando, assim, a interferência da coloração das amostras de biodiesel. As imagens foram capturadas usando a câmera de um telefone celular e convertidas para os valores RGB por um aplicativo de uso gratuito. Os valores do canal R foram inversamente proporcionais à intensidade da cor. Utilizando a estratégia de frasco único, para amostras de biodiesel, as respostas foram lineares de 10 a 106 g l₂/100 g, com coeficiente de variação e limite de detecção estimados em 5,0% (n = 8) e 2,5 g $I_2/100$ g, respectivamente. Os valores correspondentes para óleos vegetais foram de 20 a 144 g $I_2/100$ g, 3,0% (n = 10) e 7 g $I_2/100$ g, respectivamente. No spot test, resposta linear foi observada de 10 a 106 g l₂/100 g de biodiesel, com coeficiente de variação e limite de detecção estimados em 5,0% (n = 10) e 8 g $I_2/100$ g, respectivamente. O procedimento baseado em frasco único consumiu apenas 1,2 mL de amostra, 365 µg de l₂ e 40 mg de KI com ca. 2,4 mL de resíduos gerados por determinação. O consumo de reagentes foi ainda menor no spot test, que consumiu apenas 50 µg de I_2 e gerou 65 µL de efluente por determinação. Os resultados para amostras de biodiesel e óleos vegetais foram concordantes com os obtidos pelos procedimentos de referência em nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: Insaturação. Estabilidade oxidativa. Biocombustível. Química analítica verde.

¹ SOARES, S.; LIMA, M. J. A.; ROCHA, F. R. P. A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 133, p. 195–199, 2017.

² SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Fast spectrophotometric determination of iodine value in biodiesel and vegetable oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v 0, p. 1–6, 2018.

Abstract

lodine value is an important parameter to evaluate the quality of biodiesel and vegetable oils, because it is related to the degree of unsaturation of triglycerides and alkyl esters, and thus the oxidative stability of the products. Non-compliant values for biodiesel can result in corrosion and clogging of parts of the engines. Monitoring in vegetable oils is important to evaluate the product degradation, thus assuring its characteristic odor and taste. In this context, two alternative procedures were developed for iodine value determination. The first one was based on the single vial principle and it was applied to biodiesel and vegetable oils; the second one was a quantitative spot test applied to biodiesel samples. Both procedures were based on dissolution of I₂ (from an aqueous triiodide or an ethanolic iodine solution) and halogenation of unsaturated compounds in the samples. The single vial procedure was based on the discoloration of the I_3 solution; the remaining fraction of I_3 , quantified by spectrophotometry in the aqueous phase (450). In the spot test, the remaining I_2 was determined after complex formation with starch on a paper surface, thus avoiding the effect of background absorption by the biodiesel samples. The images were captured using cell phone camera and converted to the RGB values by a free application software. The values of the R channel were inversely proportional to the iodine value in the samples. Using the single vial strategy, responses were linear from 10 to 106 g I₂/100 g biodiesel, with coefficient of variation and limit of detection estimated at 5.0% (n = 8) and 2.5 g $I_2/100$ g, respectively. The corresponding values for vegetable oils were 20 to 144 g $I_2/100$ g, 3.0% (n = 10), and 7 g $I_2/100$ g, respectively. A linear response was observed from 10 to 106 g $I_2/100$ g of biodiesel in the spot test, with coefficient of variation and detection limit estimated at 4.9% (n = 10) and 8 g I_2 / 100 g, respectively. The procedure consumed only 1.2 mL of sample, 365 µg of I₂, and 40 mg of KI with 2.4 mL of waste generated per determination. The spot test consumed only 50 µg of I₂ and generated 65 µL of effluent per determination. The results for biodiesel and vegetable oil samples agreed with those obtained by the official methods at the 95% confidence level.

Keywords: Unsaturation. Oxidative stability. Biofuel. Green analytical chemistry.

3.1. Introdução

O índice de iodo é um importante parâmetro no controle de qualidade de biodiesel e de óleos vegetais, pois é um indicador da estabilidade oxidativa [5]. Esses produtos passam por várias etapas de produção, transporte e armazenamento, que podem demandar longos períodos de tempo [52]. A extração do óleo vegetal pode ser realizada com o uso de força mecânica (prensagem) e/ou solventes orgânicos. Esses fatores podem causar a degradação e alterar a qualidade dos produtos [53].

Essencialmente, gordura animal difere dos óleos vegetais quanto à predominância de ácidos graxos insaturados (óleos vegetais) ou saturados (gordura animal). Os óleos vegetais são constituídos por triglicerídeos e contém outras espécies em menores proporções, como os mono e diglicerídeos, ácidos graxos livres, tocoferóis, proteínas, esteróis e vitaminas. Os triglicerídeos vegetais possuem um maior número de insaturações em relação às gorduras animais e, por isso, se encontram no estado líquido à temperatura ambiente [53,54]. Alguns óleos, como aqueles extraídos de girassol, canola e soja, depois de refinados, são destinados para o preparo de alimentos. Os óleos produzidos em grande escala, como o óleo de soja ou aqueles que não podem ser consumidos, como o óleo de algodão, são destinados à produção de biodiesel [55,56].

O índice de iodo está diretamente relacionado ao grau de insaturação dos ésteres de alquila e triglicerídeos [57,58]. Esse parâmetro parte do princípio de que cada dupla ligação presente nos compostos insaturados reage com dois átomos de halogênios como, por exemplo, o l₂. O número de gramas de l₂ consumido por 100 gramas de biodiesel é chamado de número, índice ou valor de iodo [59,60]. A Resolução 42 da ANP não determina um limite para o índice de iodo no biodiesel, devendo apenas ser registrado seu valor. A norma europeia EN14214 estipula um valor máximo de 120 g l₂/100 g para o biodiesel. Ambas as especificações adotam o método titulométrico de Wijis, descrito na norma EN 14111, para a determinação do índice de iodo, que requer reagente e solvente tóxico (cloreto de iodo e tetracloreto de carbono), além de ser moroso e gerar elevado volume de resíduos tóxicos [61]. Outros procedimentos alternativos ao método oficial para a determinação de índice de iodo em biodiesel utilizam volumetria com detecção visual, [62] ou potenciométrica [63], NIR [64] e ressonância magnética nuclear (H NMR, do inglês

Nuclear Magnetic Resonance) [65]. Entretanto, apesar de serem alternativas eficientes ao método oficial, também envolvem procedimentos laboriosos [62,63] e equipamentos de alto custo [64,65]. Diante disso, e com o crescimento na produção de óleos para fins alimentícios e de biodiesel, tem se buscado desenvolver rotas tecnológicas e procedimentos analíticos mais práticos e rápidos. As análises *em frasco único* e *spot test* são alternativas atraentes, pois o uso de pequenas quantidades de reagentes e solventes, bem como o preparo da amostra e reação em um único frasco torna os procedimentos muito mais simples. Nesse contexto, essa parte da dissertação teve como proposta o desenvolvimento de procedimento utilizando as estratégias de frasco único e *spot test* para a determinação de índice de iodo em óleos vegetais refinados e degomados, e biodiesel. O óleo degomado é o óleo bruto que passa por uma etapa de remoção da lecitina (mistura de glicolípidos, triglicéridos e fosfolípidos). Esse óleo é destinado à exportação, a produção de biodiesel e para as empresas de refino [66].

3.2. Parte experimental

3.2.1. Procedimento em frasco único

3.2.1.1. Equipamentos e acessórios

O procedimento foi realizado em tubos de polipropileno tipo Falcon de 15 mL. Foi utilizado um agitador vortex da Nova Instruments com capacidade de agitação de 1800 rpm e uma centrífuga Quimis, modelo 6222T108. Uma seringa de plástico (5 mL) foi adaptada a um tubo de Tygon[®] (2,8 mm *d.i.*) para retirada da fase aquosa para as medidas espectrofotométricas. Essas foram realizadas com um espectrofotômetro UV-visível da marca Femto, modelo 700 Plus, em uma cubeta de quartzo (1,00 cm de caminho óptico e 1 mL de volume).

3.2.1.2. Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico (Merck) e água ultrapura (resistividade > 18,2 M Ω cm).

Amostras de biodiesel e de óleo de soja degomado foram obtidas diretamente de usinas produtoras de biodiesel e os óleos refinados foram comprados em
supermercado. As amostras de biodiesel foram acompanhadas por certificados de análise e estavam dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pela ANP. Amostras de biodiesel e de óleo vegetal de referência (*i.e.* com índice de iodo previamente determinado pelo procedimento de referência para biodiesel [62] e óleo vegetal [67]) foram utilizadas para a otimização dos procedimentos e para o preparo das soluções de calibração, com diluições de 0 a 100% (v/v) em hexano. Para a avaliação de exatidão, foram utilizadas amostras de biodiesel produzido a partir de óleo de soja puro e em misturas com óleo de algodão ou com gordura animal, além de amostras de óleos refinado de canola, soja e girassol e óleo de soja degomado.

Para o preparo da solução 1,20 mmol L⁻¹ I₃⁻ em 0,210 mol L⁻¹ KI, 30,0 mg de I₂ foi dissolvido em 15,0 mL de etanol e a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, ao qual foi adicionado 3,5 g de KI dissolvido em água, sendo o volume final ajustado com água. Essa solução foi preparada semanalmente. Hexano foi utilizado para a medida dos sinais de referência, para preparar uma solução estoque de óleo vegetal 1:1 (v/v), para diluir as amostras de biodiesel 1:1 (v/v) e óleo vegetal 1:2 (v/v), bem como para a construção da curva analítica por diluição do biodiesel ou óleo vegetal de referência em frações de 0-100% (v/v).

3.2.1.3. Procedimento

O procedimento analítico foi realizado, conforme ilustrado na Figura 1. Primeiramente, foram adicionados 1,0 mL de biodiesel ou 1,2 mL de óleo vegetal, diluídos 1:1 (v/v) ou 1:2 (v/v) em hexano, respectivamente, e 1,2 mL de solução de I_3 . Os tubos foram agitados em vortex por 5 min para a extração do I_2 para a fase orgânica e reação com os compostos insaturados. Posteriormente, essa mistura foi centrifugada para separação das fases e a fase aquosa que continha o $I_3^$ remanescente foi retirada com uma seringa para a medida espectrofotométrica em 450 nm. Todas as medidas foram realizadas em triplicata



Figura 1- Representação esquemática do procedimento em frasco único para a determinação de índice de iodo em biodiesel e óleos vegetais

3.2.2. Spot test

3.2.2.1. Equipamentos e acessórios

Foi utilizado tubos Eppendorf[®] de 1,5 mL, um telefone celular Motorola, modelo Moto X, com sistema operacional Android 6.0 e câmera de 13 megapixels. A área de captura da imagem foi de 32x32 pixels. O ambiente de trabalho teve iluminação controlada emitida por uma lâmpada tubular fluorescente (Philips, 32 W). Utilizando um suporte adaptado no próprio laboratório o celular foi posicionado a 5,0 cm da amostra. As soluções foram depositadas em um papel de filtro quantitativo hidrofílico (Nalgon[®]) com uma forma circular de 6 mm de diâmetro, tendo um papel hidrofóbico de 5 cm como suporte. Os valores de RGB foram obtidos utilizando o aplicativo PhotoMetrix[®] 1.1.1. [51]. As respostas do canal R (sistema RGB) foram transportadas para o Microsoft Excel[®] 2013 e tratadas como medidas de reflectância.

3.2.2.2. Reagentes e soluções

Para o preparo das soluções 8,0 mmol L^{-1} I_2 e 1,0% (m/v) amido foram dissolvidos 20,0 mg de I_2 em 10,0 mL de etanol e 1,00 g de amido em 100 mL de água quente. A solução de I_2 foi preparada semanalmente e a de amido diariamente e mantida ao abrigo da luz.

3.2.2.3. Procedimento

O procedimento foi realizado em tubos Eppendorf[®] de 1,5 mL, nos quais foram misturados manualmente 40 μ L da amostra e 25 μ L da solução alcoólica de I₂. Após 5 min de reação, 5 μ L dessa mistura foi transferida para o papel de filtro. Posteriormente, foi adicionado 5 μ L da solução de amido para formar o complexo com o I₂ remanescente. As medidas de reflectância foram realizadas com a câmera do celular (Figura 2), sendo que a reflexão total (superfície branca) e absorção total (papel azul intenso) correspondem a valores de R de 255 e 0, respectivamente. A diferença entre as respostas obtidas com amostra e substituindo a amostra por hexano foi tomada como o sinal analítico. Todas as amostras foram diluídas 1:1 (v/v) em hexano e as medidas foram realizadas em triplicata.

Figura 2- Diagrama esquemático do *spot test* para a determinação do índice de iodo em biodiesel. (a) Reação de biodiesel com I_2 ; (b) Mistura e tempo de reação; (c) transferência de 5 µL da mistura para o papel; (d) adição de 5 µL de amido 1% (m/v) e (e) aquisição do valor RGB empregando o software PhotoMetrix[®] 1.1.1



3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Procedimento em frasco único

3.3.1.1. Aspectos gerais

A determinação de índice de iodo foi baseada na descoloração de uma solução aquosa de I_3^- adicionada às amostras, devido à halogenação dos compostos insaturados (equações 2 e 3). A hipótese é que a fração de I_3^- remanescente, quantificada na fase aquosa em 450 nm (Figura 3), é inversamente

proporcional à quantidade de compostos insaturados nas amostras de biodiesel e óleo vegetal. O procedimento proposto envolve três etapas: (i) extração do I_2 para a fase orgânica, (ii) reação de halogenação e (iii) extração do I_2 remanescente da fase orgânica para a fase aquosa na forma de I_3^- .



Figura 3- Espectro de absorção de uma solução de 86 mmol L⁻¹ I₃-



Tanto o biodiesel (fase orgânica), quanto a solução de l₃ (fase aquosa) possuem coloração amarela, mas devido à imiscibilidade do biodiesel na fase aquosa a coloração do biodiesel não interferiu nas medidas analíticas.

A reação de halogenação foi favorecida porque o I_2 é mais solúvel no meio orgânico, portanto a utilização de KI é essencial para a extração do I_2 remanescente na forma de I_3^- para a fase aquosa. Visando garantir a solubilidade do I_2 remanescente na fase aquosa, a concentração do KI foi inicialmente 80 vezes maior do que a de I_2 .

Além do consumo de I₂ na halogenação dos compostos insaturados, a descoloração da solução de l₃ pode ser causada pela solubilização do l₂ na amostra. Para que a calibração possa ser realizada com soluções de referência (biodiesel ou óleo vegetal) com diferentes diluições em um solvente orgânico, a solubilidade do l2 não deve ser significativamente alterada com a adição do solvente. Assim, foi solubilidade diferentes avaliada а do I_2 em solventes, como hexano. 1-hexanol, 1-octanol, xileno, álcool amílico e n-decano, utilizando 1,6 mL de uma solução 86 mmol L^{-1} I_3^{-} e monitorando visualmente a quantidade de I_2 extraída para a 1 mL de fase orgânica. O n-hexano e o n-decano foram os solventes em que o I_2 teve a menor solubilidade. Diante disso, optou-se por utilizar o n-hexano, por ser mais barato que o n-decano e por ser usualmente empregado para a diluição das amostras em procedimentos para a determinação de parâmetros de qualidade de biodiesel [68].

3.3.1.2. Otimização (determinação de índice de iodo em biodiesel)

O procedimento foi otimizado pelo método univariado. Foi avaliada a concentração de I_2 , mantendo constantes a concentração de 86 mmol L⁻¹ KI e os volumes do reagente e de biodiesel em 1,2 e 1,0 mL, respectivamente. Os intervalos de tempo para a reação do I_2 com os compostos insaturados e para a separação das fases foram mantidos em 5 e 2 min, respectivamente. Os sinais analíticos e de referência aumentaram linearmente com a concentração de até 1,5 mmol L⁻¹ I_2 (Figura 4). Esse aumento linear indica que não houve saturação da fase orgânica com I_2 e a maior quantidade de I_2 dissolvido no biodiesel favorece a reação de halogenação, resultando em aumento de sinal analítico. Embora com 0,3 mmol L⁻¹ I_2 já havia excesso de reagente, escolheu-se para estudos posteriores a concentração

de 1,2 mmol L⁻¹ l₂, devido ao ganho de sensibilidade (Figura 4). Não foram avaliadas concentrações mais elevadas, pois a sensibilidade já era adequada para a aplicação proposta e maiores concentrações implicariam em valores de absorbância maiores que 1,0 e, portanto, aumento da incerteza na medida espectrofotométrica.

Figura 4- Efeito da concentração de I_2 sobre os sinais de referência (a) e analítico (b). Biodiesel obtido a partir de 90% de óleo de soja e 10% de gordura animal. Condições experimentais: 86 mmol L⁻¹ KI, 1,0 mL de biodiesel, 1,2 mL de reagente e 5 min de reação. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



O iodeto é essencial para a extração do I_2 remanescente de volta para a fase aquosa. Com relação ao efeito desse parâmetro, houve variação pouco significativa no sinal analítico (inferior a 2%) até a concentração de 160 mmol L⁻¹ (Figura 5). Porém, quando uma solução com essa concentração foi utilizada para construir a curva de calibração, não foi obtida boa linearidade (r = 0,961). Esse problema foi resolvido utilizando uma concentração de 210 mmol L⁻¹ KI (r = 0,998), que facilitou a extração do I_2 remanescente para a fase aquosa. Para concentrações maiores de 210 mmol L⁻¹ iodeto, o sinal analítico aumentou porque a partição de I_2 para a fase orgânica foi dificultada. **Figura 5-** Efeito da concentração de KI sobre os sinais de referência (a) e analítico (b). Condições experimentais definidas na legenda da Figura 4, com 1,2 mmol $L^{-1} I_2$. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



O tempo para a reação de halogenação é um fator importante, pois na ausência de temporização reprodutível, as medidas precisam ser realizadas em condições de equilíbrio. Os resultados obtidos (Figura 6) indicam que a condição de equilíbrio é alcançada a partir de 2 min de reação. No entanto, para garantir a obtenção do estado estacionário, mesmo com temperaturas ambientes mais baixas (experimento realizado a 30 °C), foi selecionado um tempo de reação de 5 min. Na Figura 6, observa-se que o mesmo comportamento é observado quando a amostra de biodiesel foi diluída em hexano.

Figura 6- Efeito do tempo de reação dos compostos insaturados com o I_2 sobre o sinal de referência (a) e analítico (b) e (c), referente a análise do biodiesel diluído 1:1 (v/v) em hexano e sem diluição, respectivamente. Biodiesel obtido a partir de 90% de óleo de soja e 10% de gordura animal. Condições experimentais: 1,2 mmol L⁻¹ I_2 , 210 mmol L⁻¹ KI, 1,0 mL de biodiesel, 1,2 mL de reagente. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



3.3.1.3. Otimização (determinação de índice de iodo em óleos vegetais)

Devido às quantidades significativas de ácidos graxos livres presentes nos óleos vegetais, foram formadas emulsões quando as amostras foram processadas nas condições otimizadas para a análise de insaturados em biodiesel, como relatado na literatura [69]. Esse inconveniente foi evitado pela diluição da amostra em hexano e usando uma agitação mais branda. Foi avaliado experimentalmente que as melhores condições para evitar formação de emulsão foram atingidas quando o óleo vegetal foi diluído 1:2 (v/v) em hexano e agitação por 5 min. O procedimento foi realizado utilizando 1,2 mL de amostra, ao invés de 1,0 mL como no procedimento para a determinação de índice de iodo em biodiesel, para compensar parcialmente a diminuição da quantidade de compostos insaturados devido à diluição da amostra. Foi avaliado o efeito do tempo de reação entre o I_2 e os compostos insaturados presentes nos óleos vegetais. O melhor tempo de reação foi de 5 min, diferente de quando a amostra foi o biodiesel, em que foram necessários somente 2 min de reação. Isso foi devido à agitação mais branda utilizada, que deve ter afetado a eficiência de extração do I_2 para a fase orgânica. Diante dessas condições, o tempo de 5 min foi escolhido como a condição ótima (Figura 7).

Figura 7- Efeito do tempo de reação dos compostos insaturados em óleo vegetal com o I_2 sobre o sinal de referência (a) e analítico (b). A otimização foi realizada com óleo de soja refinado díluido 1:2 (v/v) em hexano. Condições experimentais: 1,2 mmol L⁻¹ I_2 , 210 mmol L⁻¹ KI, 1,2 mL de óleo vegetal, 1,2 mL de reagente. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



As concentrações de 210 mmol L⁻¹ KI e 1,2 mmol L⁻¹ I₂ otimizadas para a determinação de índice de iodo em biodiesel foram mantidas para determinação de índice de iodo em óleos vegetais.

3.3.1.4 Características analíticas

Utilizando as condições otimizadas, respostas lineares para amostras de biodiesel e óleo vegetal foram obtidas de 10 a 106 e 20 a 144 g $I_2/100$ g, descritas pelas equações A = 0,0317 + 0,0051C (r = 0,998) e A = 0,0650 + 0,0024C (r = 0,999), respectivamente. Para amostras de biodiesel obtido a partir de 90% de óleo de soja e 10% de gordura animal, o coeficiente de variação e o limite de detecção foram estimados em 5,0% (n = 8) e 2,5 g $I_2/100$ g, respectivamente; enquanto que os valores correspondentes para amostras de óleos vegetais foram de 3,0% (n = 10) e 7 g $I_2/100$ g. Foram consumidos apenas 1,2 mL de amostra, 365 µg de I_2 e 42 mg de KI e gerados *ca.* 2,4 mL de resíduo por determinação.

Foram comparados os sinais obtidos a partir da análise de diferentes amostras de biodiesel e óleo vegetal (com o mesmo índice de iodo) para avaliar a possibilidade de utilizar apenas uma curva de calibração para analisar biodiesel produzido de diferentes matérias-primas, bem como utilizar uma curva de calibração construída com óleo refinado para analisar tanto óleos refinados como degomados. O sinal obtido analisando-se biodiesel produzido de óleo de soja e sebo (0,467 ± 0,007) foi 15% inferior aos sinais obtidos com biodiesel produzido de óleos de soja e algodão (0.540 ± 0.009) e somente óleo de soja (0.540 ± 0.01) . Diferenças mais significativas (ca. 70%) foram observadas comparando os sinais analíticos obtidos para amostras de óleos de milho refinado e degomado. Essas diferenças indicaram a ocorrência de efeitos de matriz, devido à diferença de solubilidade do l₂ em diferentes tipos de biodiesel e óleo vegetal, e que curvas de calibração obtidas com biodiesel proveniente exclusivamente de óleos vegetais não poderiam ser utilizadas para a quantificação de índice de iodo em amostras provenientes de gordura animal, bem como curvas de calibração obtidas utilizando óleos refinados (soja, milho ou canola) não poderiam ser utilizadas para quantificar índice de iodo em óleo de soja degomado. Efeitos similares foram observados em um procedimento em batelada para a determinação de glicerol em biodiesel [22]. Para tentar corrigir os efeitos de matriz, utilizou-se a calibração pelo método das adições de analito, adicionando-se biodiesel de soja (referência), com índice de iodo previamente determinado pelo procedimento de referência. Porém, a correção não foi eficiente e os resultados também foram discrepantes. Isso provavelmente devese à inadequabilidade da adição de um biodiesel obtido a partir de uma matériaprima para corrigir efeitos de matriz em amostras provenientes de outras fontes.

Uma alternativa para a quantificação de índice de iodo pelo procedimento proposto é a compatibilização de matriz. Apesar de mais trabalhosa, essa alternativa é viável, pois segundo o artigo nº 5 da resolução da ANP Nº 45 de 25/08/2014 [70], é obrigatório que os produtores forneçam aos laboratórios credenciados pela ANP informações sobre o material graxo e proporções utilizadas na produção do biodiesel. Para avaliar a exatidão, algumas amostras de biodiesel, óleo vegetal refinado e óleo vegetal degomado foram analisadas pelo procedimento proposto e pelos procedimentos volumétricos de referência [62,67] (Tabelas 2 e 3). Para avaliar a exatidão, os valores médios foram comparados pelo teste *t* pareado e os valores obtidos para *t* calculado (1,29 para biodiesel e 0,51 para óleo) foram abaixo do *t* crítico (2,57), indicando que os resultados são concordantes a nível de 95% de confiança.

Biodiesel	Índice de lodo	(g l ₂ /100 g de	
(matéria-prima)	amostra)*		
	Proposto	Referência [62]	**F _{calculado}
100% soja	109 ± 1	106 ± 2	4,0
90% soja/ 10% gordura animal	103 ± 1	106 ± 1	1,0
90% soja/ 10% algodão	124 ± 1	104 ± 1	1,0
90% soja/ 10% gordura animal	106 ± 2	106 ± 2	1,0
90% soja/ 10% gordura animal	108 ± 2	98 ± 6	9,0
100% soja	108 ± 1	103 ± 1	1,0

Tabela 2-Índicesdeiododasamostrasdebiodieselanalisadaspelosprocedimentos proposto e de referência

*Média \pm desvio padrão (n = 3); **F_{crítico} = 19 (95% de confiança)

Amostra	Indice de iodo (g $I_2/100$ g de amostra)^			
-	Proposto	Referência [67]	**F _{calculado}	
Soja refinado	133 ± 1	143 ± 1	1,0	
Milho refinado	124 ± 3	116 ± 4	1,8	
Canola refinado	118 ± 6	112 ± 2	9,0	
Canola refinado	106 ± 4	110 ± 2	4,0	
Soja degomado	133 ± 5	130 ± 2	6,2	
Soja degomado	123 ± 6	123 ± 3	4,0	

 Tabela 3- Índices de iodo das amostras de óleo vegetal refinado e degomado

 determinados pelos procedimentos proposto e de referência

*Média ± desvio padrão (n = 3); **F_{crítico} = 19 (95% de confiança)

O procedimento proposto consumiu apenas 365 µg de l₂ e 40 mg de KI, além de ser rápido, prático e gerar resultados confiáveis em curto período de tempo e necessitar apenas de equipamentos e materiais simples, como agitador vortex, centrífuga, espectrofotômetro, tubos tipo falcon e uma cubeta para realizar a análise. Para preparo da amostra é necessário apenas a diluição do biodiesel e dos óleo vegetais em hexano. Além disso, o preparo da amostra e a reação ocorrem no mesmo tubo, o que evita contaminações e perdas do analito. Essas características tornam o procedimento bastante atraente para análises de rotina, sendo uma alternativa ao método oficial EN 14111.

3.3.2. Spot test para a determinação de índice de iodo

3.3.2.1. Aspectos gerais

Durante o desenvolvimento do procedimento para a determinação de índice de iodo, descrito no item 3.3.1, vislumbrou-se a possibilidade de se desenvolver um procedimento ainda mais simples, que não fosse susceptível a efeitos de matriz e pudesse ser implementado em usinas de produção de biodiesel. Este consistiu em um *spot test,* também baseado no consumo de I₂ devido à halogenação dos compostos insaturados constituintes do biodiesel. Entretanto, propôs-se uma

drástica redução dos volumes de amostra e reagentes utilizados, e a medida, após a à deposição de alíquotas de reagente em papel de filtro, explorando imagens digitais obtidas com a câmera de um telefone celular. Devido à similaridade da cor do biodiesel com a do I₂, o amido foi adicionado para formar um complexo azul com o I₂ remanescente e evitar o efeito da coloração das amostras, como mostra a Figura 8. Inicialmente, o biodiesel e a solução de l₂ preparada em etanol foram depositados em papel de filtro, mas a reação de halogenação prosseguiu muito lentamente, principalmente após a evaporação do solvente. Assim, a amostra e o reagente foram misturados em tubos de Eppendorf®, devido à alta miscibilidade entre biodiesel e etanol, a reação foi conduzida em um sistema monofásico. Logo após a reação, um pequeno volume da mistura foi transferido para o papel de filtro visando as medidas analíticas. Isso foi necessário porque as medidas sendo realizadas na superfície do papel facilita a interação do amido com o I₂ remanescente. As medidas da intensidade de cor utilizando a câmera de um telefone celular foram tratadas como reflectância. Foi observada melhor correlação entre o sinal analítico e o índice de iodo das amostras utilizando apenas o valor R, por corresponder à cor complementar do complexo iodo-amido. Reflexão total (superfície branca) e absorção total (papel intenso azul) correspondem a valores de R de 255 e 0, respectivamente.

Figura 8- Espectros de absorção de uma mistura de biodiesel-hexano 1:1 (v/v) com (a) e sem (b) 8 mmol L⁻¹ I₂; (c) mistura de biodiesel-hexano 1:1 (v/v) + 8 mmol L⁻¹ I₂ + amido (medida na fase aquosa). As linhas tracejadas correspondem à região espectral referente ao valor de R



3.3.2.2. Otimização

O procedimento foi otimizado pelo método univariado, visando maior resposta analítica, menor consumo de reagente e de solvente, assim como uma maior precisão dos resultados.

A concentração de l₂ é um parâmetro importante, pois é necessário garantir excesso de reagente para reagir com os compostos insaturados, bem como que haja uma fração remanescente para as medidas analíticas. Por outro lado é necessário evitar largo excesso de l₂ remanescente, pois isso causaria a saturação do canal R, ou seja, absorção de toda a radiação incidente, inviabilizando as medidas analíticas. Conforme resultados apresentados na Figura 9, a condição ótima foi alcançada com 8 mmol L⁻¹ l₂, concentração selecionada para estudos posteriores. A saturação do sinal ocorreu a partir de 20 mmol L⁻¹ l₂ visto que, com concentrações superiores, não houve diferenças significativas nos sinais analíticos.

Figura 9- Efeito da concentração de I_2 sobre os sinais analítico (a) e de referência (b). Biodiesel obtido de 90% de óleo de soja e 10% de gordura animal (v/v). Condições experimentais: 100 µL de biodiesel, 60 µL de 8 mmol L⁻¹ I₂, 5 µL de amido e 1 min de reação de halogenação. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



Mantendo-se 60 μ L da solução 8 mmol L⁻¹ l₂, variou-se o volume de biodiesel, com a finalidade de estabelecer o volume de amostra mais adequado para reagir com o l₂. As respostas analíticas foram minimizadas quando utilizou-se 10 ou 300 μ L de biodiesel (Figura 10). Com 10 μ L de biodiesel, o consumo de l₂ foi baixo, devido à baixa quantidade de compostos insaturados disponíveis, resultando em excesso de l₂ remanescente e diferenças pouco significativas em relação ao sinal de referência. Por outro lado, quando utilizou-se 300 μ L de biodiesel, toda a radiação incidente foi refletida, indicando excesso de amostra, consumindo completamente o l₂ na reação com os compostos insaturados. Neste caso, o alto sinal analítico (*i.e.* baixa absorção de radiação) obtido quando a amostra foi substituída por hexano, deve-se à diluição da solução de l₂. O volume de amostra selecionado foi de 100 μ L, que gerou a maior diferença entre os sinais obtidos com o biodiesel e hexano. **Figura 10-** Efeito do volume de biodiesel sobre os sinais analítico (a) e de referência (b). Condições experimentais definidas na legenda da Figura 9 com 60 μ L de 8 mmol L⁻¹ I₂. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



Foi avaliado o efeito do tempo de reação dos compostos insaturados com o I_2 , com a finalidade de garantir que as medidas fossem realizadas em estado de equilíbrio e no menor tempo possível. Essa condição foi alcançada com 5 min de reação.

A reação entre os compostos insaturados e o I_2 foi realizada em tubos do tipo Eppendorf® e, neste estágio, o procedimento proposto consumia 60 µL de I_2 e 100 µL de biodiesel ou soluções de referência diluídas em hexano. Entretanto, somente 5 µL dessa mistura era transferida para o papel de filtro, para posterior adição da solução de amido. Com a intenção de minimizar esse desperdício, diminuiu-se de 2,5 a 20 vezes o volume da mistura I_2 e amostra, mantendo-se a mesma proporção volumétrica amostra:reagente. Nas medidas com biodiesel, mesmo com os menores volumes avaliados, os resultados foram compatíveis com os obtidos anteriormente. Entretanto, quando se utilizou o hexano como diluente para construir a curva de calibração, a linearidade não foi adequada (r = 0,931), devido às perdas de hexano por evaporação (temperatura de ebulição: 68 °C). Verificou-se que esse problema não era crítico para volume total de 65 μ L, desde que as medidas fossem feitas imediatamente após a reação dos compostos insaturados com o I₂. Sendo assim, o procedimento foi realizado com 25 μ L de I₂ e 40 μ L de biodiesel. Isso corresponde a uma redução de 2,5 vezes em relação aos volumes utilizados inicialmente.

3.3.2.3. Avaliação de robustez

Para avaliar a robustez do procedimento, foi aplicado um planejamento fatorial 2³ com ponto central [72]. Os resultados otimizados foram fixados no ponto central e utilizou-se uma variação de 10% em relação aos resultados otimizados para o nível menor (-) e maior (+) do planejamento (Tabela 4).

Utilizando a análise de variância (ANOVA), verificou-se que os resultados obtidos com as variações de 10% e as interações entre os parâmetros (concentração de l₂, volume de biodiesel e tempo de reação) não demonstraram diferenças significativas com 95% de confiança, indicando que o procedimento é robusto a variações nas condições experimentais neste intervalo. O gráfico de pareto (Figura 11) ilustra esse comportamento. Essa é uma condição importante para um procedimento voltado a análises *in situ*, em que o controle das condições experimentais pode não ser tão rigoroso quanto no laboratório.

Experimento	Concentração de	Volume de	Tempo de	Sinal
	I_2 (mmol L ⁻¹)	biodiesel (µL)	reação (min)	
1	-1 (8)	-1 (18)	-1 (4)	217 ± 3
2	+1 (10)	-1 (18)	-1 (4)	216 ± 5
3	-1 (8)	+1 (22)	-1 (4)	217 ± 8
4	+1 (10)	+1 (22)	-1 (4)	221 ± 6
5	-1 (8)	-1 (18)	+1 (6)	210 ± 10
6	+1 (10)	-1 (18)	+1 (6)	214 ± 5
7	-1 (8)	+1 (22)	+1 (6)	228 ± 3
8	+1 (10)	+1 (22)	+1 (6)	214 ± 3
9	0 (9)	0 (20)	0 (5)	213 ± 6
10	0 (9)	0 (20)	0 (5)	209 ± 8

Tabela 4- Planejamento fatorial 2³ para a avaliação de robustez do procedimento

Figura 11- Gráfico de pareto com os efeitos das principais variáveis e suas interações estimadas para a avaliação de robustez



3.3.2.4. Características analíticas

Nas condições otimizadas, resposta linear foi obtida de 10 a 106 g $I_2/100$ g de biodiesel, descrita pela equação S = 0,107 + 0,006 C (g $I_2/100$ g), r = 0,991, na qual S e C se referem ao sinal analítico e ao índice de iodo, respectivamente. O coeficiente de variação foi estimado em 5,0% (n = 10). Para a estimativa do limite de detecção (8 g $I_2/100$ g), uma amostra de biodiesel produzido de óleo de soja foi sucessivamente diluída em hexano e foi avaliada a menor fração da mistura que gerou um sinal analítico significativamente diferente do sinal obtido substituindo o biodiesel por hexano. Foram consumidos apenas 40 µL de amostra e 50 µg de I_2 e gerados *ca*. 65 µL de resíduo por determinação. O procedimento proposto consome cerca de 2000 vezes menos I_2 que o procedimento de referência [62].

A possível ocorrência de efeitos de matriz foi avaliada comparando-se os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com biodiesel produzido a partir de óleo de soja / gordura (90/10% (v/v)), óleo de soja / óleo de algodão (90/10% (v/v)) e óleo de soja (100% (v/v)). Estas curvas apresentaram coeficientes angulares de 0,00630 ± 0,00200; 0,00722 ± 0,00189 e 0,00684 ± 0,00168, respectivamente. Como as inclinações não são significativamente diferentes em nível de 95% de confiança, considerando as incertezas associadas, é possível a utilização de calibração externa para a determinação de índice de iodo em biodiesel proveniente de diferentes matérias-primas. Essa é uma vantagem significativa em relação ao procedimento desenvolvido anteriormente. Ο comportamento distinto observado nos procedimentos baseados no mesmo princípio de medida foi atribuído a não necessidade de extração do l₂ da fase aquosa para a fase orgânica. Essa conclusão é baseada na hipótese de que o l₂ deva apresentar diferentes solubilidades em biodiesel proveniente de diferentes óleos vegetais e gorduras, que resultarão em diferentes ésteres alquílicos.

Para a avaliação de exatidão, foram analisadas diferentes amostras de biodiesel pelo procedimento proposto e os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos pelo procedimento de referência [62] (Tabela 5).

Os valores de índice de iodo estão de acordo com a norma européia EN14214, que determina um limite de 100 g $I_2/100$ g de biodiesel. Para avaliar a exatidão, os valores médios foram comparados pelo test *t* pareado e o calculado (0,36) é inferior ao valor crítico (2,57), indicando que os resultados são concordantes em nível de 95% de confiança.

Biodiesel	Índice de iodo (g l ₂ /100 g de		
(matéria-prima)	biodiesel)*		
-	Proposto	Referência	
		[62]	
Óleo de soja (100% (v/v))	110 ± 7	106 ± 2	
Óleo de soja / gordura animal (90/10% (v/v))	113 ± 5	98 ± 6	
Óleo de soja / gordura animal (90/10% (v/v))	103 ± 3	106 ± 2	
Óleo de soja / gordura animal (90/10% (v/v))	116 ± 6	106 ± 1	
Óleo de algodão /gordura animal (90/10% (v/v))	95 ± 5	104 ± 1	
Óleo de soja / gordura animal (70/30% (v/v))	99 ± 5	101 ± 2	

Tabela 5- Índices de iodo das amostras de biodiesel determinados pelosprocedimentos proposto e de referência

*Média \pm desvio padrão (n = 3)

O procedimento proposto é rápido, prático, consumiu apenas 50 µg de I_2 e gerou 65 µL de resíduo por determinação e não foi influenciado pela matriz das amostras avaliadas. Além disso, utiliza apenas uma câmera de um telefone celular e um aplicativo para realização das medidas analíticas, o que torna o procedimento bastante atrativo para análises *in situ*, diretamente nas usinas de produção de biodiesel, e para ser implementado nos laboratórios de rotina.

3.3.2.5. Comparação de procedimentos para determinação de índice de iodo em biodiesel e óleo vegetal

Os procedimentos propostos baseados na estratégia de frasco único e *spot test* para a determinação de índice de iodo em óleo vegetal e biodiesel apresentaram vantagens em comparação com o método oficial e procedimentos alternativos descritos (Tabela 6).

O procedimento que utiliza H-NMR não requer solvente orgânico, mas utiliza equipamento caro, necessita de um um ambiente adequado para sua implementação e requer um profissional especializado para realizar as análises [65]. A desvantagem dos procedimentos baseados em volumetria são que eles são bastante tediosos e demorados [62,63,67,71]. A volumetria baseada em detecção visual do ponto final é dificultada pela cor da amostra ser semelhante à reagentes halogenados, ocasionando em um erro analítico maior [62,67,71]. O método volumétrico oficial EN 14111 é moroso, utiliza reagente e solvente tóxico (tetracloreto de carbono e o cloreto de iodo) [71]. O procedimento baseado em frasco único permite análises tanto de biodiesel quanto de óleos vegetais; embora tenham sido constatados efeitos de matriz, esses podem ser corrigidos por compatibilização de matriz. É um procedimento simples, que pode ser realizado por um analista que tenha apenas conhecimento básico, de como operar um espectrofotômetro. O spot test consome ca. 7 vezes menos l₂ e gera ca. 34 vezes menos resíduo que o procedimento baseado em frasco único. Além, de ser um procedimento robusto, não foram constados efeitos de matriz, possibilita obter resultados bastante precisos, mesmo com instrumentação de baixo custo (requer apenas de um celular com câmera e de um ambiente com iluminação controlada para realizar as análises), sendo adequado para análises in situ.

Procedimento Faixa linear^a Consumo de I_2 (mg) Volume de resíduo (mL) Referência Biodiesel _ EN 14111 (Wijs) 2000 > 160 71 Volumétrico com detecção visual 508 > 200 62 _ Volumétrico com detecção potenciométrica 508 > 200 63 _ H-NMR 5 – 140 65 _ _ Procedimento desenvolvido (frasco único) 10 - 106 0,365 2,2 Procedimento desenvolvido (*spot test*) 10 - 106 0.049 0,065 Óleo vegetal Volumétrico com detecção visual 5000 > 240 67 EN 14111 (Wijs) 2000 > 160 71 Procedimento proposto 10 - 106 0,365 2,2

Tabela 6- Principais características analíticas dos procedimentos para a determinação de índice de iodo em biodiesel e óleo vegetal

a. mg I₂/100 g biodiesel ou óleo vegetal

3.4. Conclusões

Os procedimentos propostos são inovadores com relação à utilização a estratégia de frasco único e de spot test utilizando imagem digital para o controle de qualidade de biodiesel e de óleos vegetais, mais especificamente para a determinação de índice de iodo. Ambos são alternativas ao método titulométrico de Wijis (EN 14111) por requererem menores quantidades de solventes e reagentes e, consequentemente, gerarem menores volumes de resíduos, além de requererem equipamentos de fácil acesso, como o celular, espectrofotômetro, vórtex e centrífuga, e não utilizar reagente e solvente tóxico, como o cloreto de iodo e tetracloreto de carbono necessários no método oficial. Não foram observados efeitos de matriz no procedimento spot test, e esses foram superados no procedimento que utilizou o sistema de frasco único utilizando a calibração por compatibilização de matriz. O procedimento spot test é atraente pela possibilidade do monitoramento in situ, i.e. diretamente na usina de biodiesel, por possuir características favoráveis para realizar esse tipo de análises, como a robustez e necessitar de apenas micropipetas, tubos de ensaio e de um telefone celular. Além disso, os dois procedimentos trabalham em uma faixa linear adequada para o valor encontrado em diferentes tipos de biodiesel e óleos vegetais. Os resultados obtidos foram concordantes com os valores de índice de iodo determinados pelos procedimentos de referência [62,67] e estão dentro do limite estabelecido pela norma européia EN14214 [5].

4. Determinação do teor de éster em biodiesel e em mistura biodiesel:diesel³

Resumo

Com o aumento significativo da produção de biodiesel e pela diversificação das matérias primas utilizadas no processo produtivo, é extremamente importante desenvolver procedimentos mais práticos e rápidos e com menores custos operacionais para o controle de qualidade. Além de garantir o desempenho, o controle de gualidade do biocombustivel visa evitar danos aos motores e ao meio ambiente. Nesse sentido, a quantificação do teor de ésteres no biodiesel permite avaliar o desenvolvimento da reação de transesterificação e a determinação do teor de biodiesel em misturas com diesel possibilita avaliar o atendimento a legislação vigente. Neste contexto foi desenvolvido um procedimento em fluxo, utilizando o processo lab-in-syringe, para a determinação de ésteres metílicos em diferentes tipos de biodiesel e de biodiesel em mistura com diesel. O procedimento foi baseado na reação dos ésteres com hidroxilamina em meio básico, para formar hidroxamato que em meio ácido, reage com Fe(III), formando um complexo com absorção máxima em 500 nm. Etanol foi utilizado como solvente mediador entre a amostra hidrofóbica e os reagentes hidrofílicos, propiciando a formação de uma fase única no interior da seringa. Respostas lineares para amostras de biodiesel e misturas diesel/biodiesel foram obtidas entre 4,0 e 99% (v/v) e 2,0 e 40% (v/v), respectivamente, descritas pelas equações: A = 0,342 + 0,00305C (r = 0,997) e A = 0,154 + 0,00503C (r = 0,999). Calibração pode ser realizada por diluição em linha de uma solução estoque de linoleato de metila. Para as amostras de biodiesel, o coeficiente de variação (n = 10), o limite de detecção (99,7% de confiança) e a frequência de amostragem foram estimados em 0,8%, 0,36% (v/v) e 15 h⁻¹, respectivamente; os valores correspondentes para a mistura biodiesel:diesel foram 0,20%, 0,03% (v/v) e 12 h⁻¹. O procedimento consome apenas 0,860 mg de hidroxilamina, 0,145 mg de ferro e 2,0 mL de etanol e gera ca. 3,0 mL de resíduo por determinação. Os resultados para amostras de biodiesel e das misturas biodiesel:diesel concordaram com os obtidos pelos métodos oficiais EN14103 e EN14078, com nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: Teor de éster. Análise em fluxo. Metil linoleato.

³ SOARES, S.; MELCHERT, W. R.; ROCHA, F. R. P. A flow-based procedure exploiting the lab-in syringe approach for the determination of ester content in biodiesel and diesel/biodiesel blends. **Talanta**, Amsterdam, v. 174, p. 556–561. 2017.

Abstract

With the increase in biodiesel production and diversification of feedstocks, it is important to develop practical, fast, and less expensive analytical procedures applied to biodiesel from different raw materials. The guality control of biodiesel aims at to ensure the performance of the biofuel and also to avoid damages to the engines and environmental impact. This includes the quantification of the ester amount to evaluate the yield of the transesterification reaction. On the other hand, quantification of the biodiesel amount in biodiesel:diesel blends, is needed to evaluate the veld of transesterification reaction. In this context, it was developed a flow-based procedure exploiting the lab-in-syringe approach for the determination of methyl esters in different kinds of biodiesel and biodiesel:diesel blends. It was based on the reaction of the esters with hydroxylamine, in alkaline medium to form hydroxamate, which reacted in acidic medium with Fe(III), forming a complex with maximum absorption at 500 nm. A single phase was formed inside the syringe by using ethanol as mediator solvent between the hydrophobic sample and the hydrophilic reagents. Linear responses for biodiesel samples and diesel/biodiesel blends were obtained from 4.0-99% (v/v) and 2.0-40% (v/v) methyl esters, described by the equations: A = 0.342 + 0.0000.00305C (r = 0.997) and A = 0.174 + 0.00503C (r = 0.999), respectively. Calibration can be performed by in-line dilution of a methyl linoleate stock solution. For biodiesel samples, the coefficient of variation (n = 10), limit of detection (99.7% confidence level), and sampling rate were estimated at 0.8%, 0.36% (v/v), and 15 h⁻¹, respectively, whereas the corresponding values for the blend samples were 0.20%, 0.03% (v/v), and 12 h⁻¹. The procedure consumed only 0.860 mg of hydroxylamine, 0.145 mg of iron and 2.0 mL ethanol and generated ca. 3.0 mL of waste per determination. The results for biodiesel and biodiesel diesel blends agreed with those obtained by official methods EN14103/2011 e EN14078 at the 95% confidence level.

Keywords: Ester content. Flow analysis. Methyl linoleate.

4.1. Introdução

Um dos principais parâmetros de qualidade a ser monitorado no biodiesel é o teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, do inglês *Fatty Acid Methyl Esters*) [5]. Segundo as normas europeia [5] e brasileira [5], o teor de éster no biodiesel deve ser no mínimo 96,5% (v/v). A norma americana [5] não estabelece o limite, mas indica que este parâmetro deve ser medido e registrado. Por outro lado, deve-se monitorar o ponto final da produção do biodiesel, assim que atingir 96,5% (v/v) de éster, evitando tempo adicional e gastos desnecessários [5]. No Brasil, a Lei nº 13.623/2016 estabeleceu que em 2018 a porcentagem de biodiesel adicionado ao diesel deve ser no mínimo 8% (v/v) [3].

O método oficial EN 14078 para quantificar biodiesel na mistura com o diesel é baseado em espectroscopia na região do infravermelho [73]. Já o método oficial EN14103 para determinação do teor de éster em biodiesel é baseado em cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID, do inglês Gas Chromatography with Flame Ionization Detector) [74]. Esse método é limitado para análise de biodiesel produzido a partir de sebo bovino, porque o padrão interno usual (heptadecanoato de metila) é uma substância encontrada em alta quantidade em biodiesel produzido a partir dessa matéria-prima [75]. Assim, para essas amostras e as provenientes de óleo de mamona, o nonadecanoato de metila é usado no lugar de heptadecanoato de metila [75]. Cromatografia líquida de alto desempenho com detecção espectrofotométrica no ultravioleta (HPLC-UV, do inglês High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection) foi proposta para a determinação simultânea de quantidades totais de glicerídeos e FAME em biodiesel produzido de óleo de soja, explorando a injeção de amostras dissolvidas em acetonitrila, sem qualquer pré-tratamento [75]. Porém, há algumas desvantagens, como o tempo de análise (ca. 35 min por determinação) e a baixa precisão (coeficientes de variação de até 10%). Procedimentos alternativos ao método oficial para quantificar biodiesel na mistura biodiesel:diesel são citados na literatura, como os que utilizam a mesma reação do procedimento proposto nessa reação [76,77], porém esses procedimentos são morosos, necessitam de várias etapas de agitação e adição de reagentes, além de utilizarem solventes tóxicos, como 10 mL [76] e 9,3 mL de heptano [77] por determinação. Embora, existam outros procedimentos alternativos aos métodos oficiais, eles são morosos, consomem quantidades

significativas de solventes e geram volumes significativos de resíduos [76,77]. Diante disso, esta etapa da dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de um procedimento versátil, rápido, robusto e ambientalmente amigável para a determinação do teor de éster em biodiesel e de biodiesel em mistura com o diesel. Para isso, foi utilizado um sistema de análises em fluxo baseado no processo *lab-in-syringe* [33, 35].

4.2. Parte experimental

4.2.1. Equipamentos e acessórios

Foi utilizado um sistema de análises por injeção sequencial (SIA) comercial (FIAlab[®] 3500, FIAlab[®] Instruments), composto por uma bomba de seringa (2,5 mL) e uma válvula seletora com 8 portas. A detecção foi feita utilizando um espectrofotômetro CCD (USB4000, Ocean Optics[®]), com uma fonte de radiação (lâmpada de tungstênio-halogênio, LS-1, Ocean Optics[®]), fibras óticas para transporte da radiação e uma cela de fluxo (Hellma) com 1,0 cm de caminho óptico e 40 μL de volume. A cela foi acoplada a um suporte (CUV-UV, Ocean Optics) posicionado perpendicularmente ao feixe de radiação O controle do sistema e a aquisição dos dados foram efetuados pelo *software* FIAlab[®] 5.9. Linhas de transmissão foram feitas de tubos de Teflon[®] com 0,75 mm *i.d.*

4.2.2. Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico (Merck, exceto quando informado) e água ultrapura (resistividade > 18,2 M Ω cm). Para o preparo da solução 0,60 mol L⁻¹ hidroxilamina, 2,0 g do reagente sólido foi previamente dissolvido em 5 mL de água e o balão volumétrico foi avolumado com etanol para 50 mL. Para o preparo de uma solução de 10,0 mmol L⁻¹ de ferro, foi preparada uma solução de 5,0 mmol L⁻¹ Fe₂(SO₄)₃.H₂O, dissolvendo 100 mg do sal em 0,6 mol L⁻¹ HNO₃. Foi preparada diariamente uma solução de 0,30 mol L⁻¹ NaOH, dissolvendo 600 mg do hidróxido em 5 mL de água e avolumando o balão volumétrico com etanol para 50 mL.

Amostra de biodiesel produzido de óleo de soja (*i.e.* com teor de éster previamente determinado pelo método de referência [74]) foi diluída 1:10 (v/v) em etanol para a otimização do procedimento. Solução estoque de linoleato de metila (éster formado predominantemente na reação de transesterificação de óleo de soja) foi preparada pela diluição do éster (99% (m/m), Sigma) em etanol 1:10 (v/v). Essa solução foi utilizada para a preparação das soluções de referência em frações de 0 a 99% (v/v) em etanol, para a construção da curva analítica. A solução estoque de linoleato de metila também foi diluída em linha para a calibração do procedimento. Para a quantificação de biodiesel na mistura biodiesel:diesel, soluções de referência de 2 a 40% (v/v) foram preparadas por diluição de linoleato de metila a 99% (v/v) em etanol 1:15 (v/v). Para avaliação de exatidão, amostras de biodiesel (produzidas a partir de óleo de soja, óleo de semente de algodão ou gorduras animais) e biodiesel misturado a diesel S10 (coloração amarela) e S500 (coloração vermelho) foram diluídas *ca.* 1:20 e 1:15 (v/v) em etanol, respectivamente.

4.2.3. Procedimento

Para a determinação do teor de ésteres em biodiesel e na mistura biodiesel:diesel foi empregado o processo lab-in-syringe (Figura 12) [66-68]. O sistema foi operado conforme descrito nas Tabelas 7 (amostras de biodiesel) e 8 (amostras de misturas biodiesel:diesel). Foram aspirados para a seringa 40 µL de biodiesel diluído (etapa 1), 20 µL de hidroxilamina (etapa 2) e 300 µL de NaOH (etapa 3), seguido de intervalo de 75 s (etapa 4) para a formação do hidroxamato. Posteriormente, foram aspirados 175 µL de Fe(III) em meio ácido (etapa 5) e 1000 µL de ar (etapa 6), para favorecer a mistura e a reação do Fe(III) com o ácido hidroxâmico. Após a reação, 200 µL de etanol anidro foram inseridos para transportar o ar para o interior da seringa (etapa 7), evitando-se, dessa forma, que bolhas de ar seguissem para a cela de medida. Na etapa seguinte, 735 µL da mistura do interior da seringa foram direcionados para a cela de fluxo para a medida espectrofotométrica em 500 nm (etapa 8). O restante da solução contida na seringa era direcionado para descarte (etapa 9). Para a limpeza da seringa e do tubo que direciona a fase de medida para a cela de detecção, utilizou-se 1200 µL de etanol (etapas 10 e 11). Todos os passos foram realizados com a válvula solenoide de três vias na posição OUT, exceto para o passo 10, em que a válvula foi movida para a posição IN. O sinal analítico correspondia ao sinal máximo registrado quando a zona de amostra passava pela cela de fluxo. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. Para a calibração envolvendo diluições em linha, o volume da solução estoque de linoleato de metila foi variado de 0 a 40 µL e alíquotas de etanol foram adicionadas para manter o volume total de 40 µL. As outras etapas anteriormente descritas foram mantidas.

Para a determinação do teor de éster em misturas biodiesel:diesel (Tabela 8), as modificações necessárias foram: (i) o aumento do volume da amostra de 40 μ L para 100 μ L (etapa 1); (ii) o aumento do período de parada de fluxo para a formação do hidroxamato, de 75 para 120 s (etapa 4); (iii), utilização de alíquota adicional de 500 μ L etanol (etapa 6) e (iv) redução do volume da alíquota de ar para 500 μ L (etapa 7).

A exatidão foi avaliada comparando-se os resultados obtidos para biodiesel de diferentes fontes com os obtidos por cromatografia gasosa, de acordo com o método oficial EN 14103 [74], e aqueles obtidos para as amostras de misturas biodiesel:diesel com os resultados obtidos por NIR, de acordo com EN14078 [73].

Figura 12- Diagrama de fluxo do sistema *lab-in-syringe* para a determinação do teor de éster em biodiesel e na mistura com o diesel. A: amostra; R₁: hidroxilamina; R₂: NaOH; R₃: Fe(III); E: etanol; W: descarte de resíduo; SP: bomba de seringa; MV: válvula de multiposição; V: válvula solenoide de três vias; D: espectrofotômetro multicanal. O comprimento dos tubos de transmissão entre as válvulas MV e V (porta 1) ou a cela de fluxo foram as menores possíveis (*ca.* 20 cm)



Etapa	Ação	MV	Volume	Vazão
		porta	(µL)	(µL s⁻¹)
1	Aspiração de biodiesel díluido	3	40	40
2	Aspiração de hidroxilamina (R1)	4	20	150
3	Aspiração de NaOH (R ₂)	5	300	200
4	Tempo de reação (75 s)	—		
5	Aspiração de Fe(III) (R ₃)	6	175	200
6	Aspiração de ar	7	1000	200
7	Aspiração de etanol (E)	8	200	100
8	Transporte para medida	1	735	20
9	Descarte	2	1000	150
10	Lavagem do sistema ^a	2	2000	150
11	Descarte	1	2000	150

Tabela 7- Rotina analítica do sistema SIA para a quantificação do teor éster em biodiesel

a.Válvula solenoide V na posição "IN"; Etapas 10 e 11 repetidas duas vezes.

Tabela	8- Rotina	analítica	do siste	ema SIA	, para a	a quantifi	cação d	e biodies	sel na
mistura	biodiesel	l:diesel							

Etapa	Ação	ΜV	Volume	Vazão
		porta	(µL)	(µL s⁻¹)
1	Aspiração da mistura biodiesel:diesel diluída	3	100	40
2	Aspiração de hidroxilamina (R1)	4	20	150
3	Aspiração de NaOH (R ₂)	5	300	200
4	Tempo de reação (120 s)			—
5	Aspiração do Fe(III) (R ₃)	6	175	200
6	Aspiração de etanol (E)	8	500	100
7	Aspiração de ar	7	500	200
8	Aspiração de etanol (E)	8	200	100
9	Medida	1	1295	20
10	Descarte	2	500	150
11	Limpeza do sistema ^a	2	2000	150
12	Descarte	1	2000	150

a. Válvula solenoide V na posição "IN"; Etapas 11 e 12 repetidas duas vezes.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Aspectos gerais

O procedimento foi baseado na reação dos ésteres de alquila com hidroxilamina, em meio alcalino, com formação de hidroxamato (equação 4). Esta espécie reage com o Fe(III) em meio ácido (necessário para evitar a hidrólise do íon metálico), formando um complexo violeta (equação 5) [78] com máximo de absorção em 500 nm (Figura 13). O procedimento em fluxo foi baseado no processo *lab-in-syringe* [33,34], visando desenvolver um procedimento rápido, robusto e versátil com o mínimo consumo de reagente e geração de resíduos, entre outras características positivas que só são alcançadas em sistemas de análise em fluxo. A modalidade explora o processamento da amostra dentro do êmbolo da bomba tipo seringa, combinando assim as características de fluxo (alta amostragem taxa e tempo reprodutível) com as características da estratégia (melhora a mistura e maior tempo de residência)

Visando gerar uma única fase entre reagentes (hidrofílicos) e amostra (hidrofóbica), o etanol foi utilizado como solvente mediador. Tanto a amostra, quanto os reagentes foram preparados em etanol para evitar a separação de fases no interior da seringa. O ar (Tabelas 7 e 8 - etapas 6 e 7) e as altas vazões de aspiração (150 e 200 µL s⁻¹) dos reagentes (Tabelas 7 e 8 - etapas 2,3,5) foram estratégias para favorecer a mistura. O etanol (etapa 7) foi aspirado a uma vazão mais baixa (100 µL s⁻¹) para evitar a formação de bolhas no caminho analítico, uma vez que o etanol foi utilizado para eliminar todo ar que havia no percurso analítico. Após a formação do complexo (Tabela 7, 8 - etapas 8 e 9) 735 e 1295 µL da fase de medida foi direcionada para a cela de fluxo a uma vazão baixa (40 µL s⁻¹), de modo a evitar a formação de bolhas. Posteriormente, 1000 e 500 µL (Tabelas 7, 8 - etapas 9 e 10) referente ao ar aspirado foram dispensados para o descarte em uma vazão de 150 µL s⁻¹ para remover resíduos do percurso analítico e otimizar a frequência de amostragem. A vazão de aspiração (150 µL s⁻¹) da lavagem do sistema (Tabelas 7, 8 - etapas 10 e 11) não foi relativamente alta (150 µL s⁻¹) para evitar que ficasse ar no percurso analítico. Os tempos de reação (Tabelas 7 e 8 - etapas 4) foram explorados para favorecer a formação do hidroxamato que é relativamente lenta.



Figura 13- Espectro de absorção do complexo formado entre Fe(III)/hidroxamato. Espectro obtido com 20 µL de biodiesel (diluição 1:20 (v/v) em etanol), 200 µL de 10 mmol L⁻¹ Fe(III) preparado em 0,65 mol L⁻¹ HNO₃, 400 µL de 0,30 mol L⁻¹ NaOH, 200 µL de etanol e 60 s de reação



4.3.2. Otimização (procedimento para a determinação de éster em biodiesel)

Foram avaliados os efeitos dos volumes dos reagentes e de amostra e do tempo de reação, visando maximizar a resposta analítica. Com relação à hidroxilamina, obteve-se a máxima resposta analítica com 20 μ L de solução de 0,62 mol L⁻¹ (Figura 14). Volumes maiores favoreceram a redução do Fe(III) a Fe(II), assim desfavorecendo a formação do complexo e causando a diminuição do sinal analítico. Por outro lado, a resposta analítica diminuiu com volumes menores devido à falta de reagente. O volume selecionado (20 μ L) fornece aproximadamente a quantidade estequiométrica de hidroxilamina para reagir com a maior quantidade de éster contida nas amostras.

Figura 14- Efeito do volume de solução de 0,60 mol L⁻¹ hidroxilamina sobre os sinais analítico (a) e do branco (b). Condições experimentais: 20 µL de biodiesel (diluição 1:20 (v/v) em etanol), 200 µL de 10 mmol L⁻¹ Fe(III) preparada em 0,65 mol L⁻¹ HNO₃, 400 µL de 0,30 mol L⁻¹ NaOH, 200 µL de etanol e 60 s de reação. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



O procedimento proposto envolve reações sequenciais em meio alcalino (formação do hidroxamato) e ácido (formação do complexo com Fe(III)). Assim, foi importante avaliar tanto o volume de NaOH quanto de ferro(III) preparado em HNO3 contido na solução de Fe(III) para que as reações fossem conduzidas em condições adequadas de acidez. A solução de hidróxido de sódio favorece tanto a formação de íons hidroxamato, quanto a formação de Fe(OH)₃. Assim, observou-se um aumento concomitante dos sinais analítico e do branco no intervalo entre 300 e 500 µL de 0,3 mol L⁻¹ NaOH, devido ao espalhamento de radiação causado pela formação de Fe(OH)₃ (Figura 15). Esse efeito tornou-se mais severo a partir de 500 µL de NaOH, prejudicando a formação do hidroxamato. Com volumes de NaOH inferiores a 300 µL, ocorreu turvação devido à imiscibilidade do biodiesel com baixas concentrações de etanol (solvente utilizado na preparação da solução alcalina), impossibilitando a medida analítica. Apesar da resposta analítica ser mais pronunciada quando foi utilizado um volume de 400 µL de NaOH, o volume de 300 µL foi escolhido para experimentos posteriores por apresentar o menor sinal do branco.

Figura 15- Efeito do volume de solução de 0,30 mol L⁻¹ NaOH sobre o sinais analítico (a) e do branco (b). Condições experimentais: 20 μ L de biodiesel (diluição 1:20 (v/v) em etanol), 20 μ L de 0,62 mol L⁻¹ NH₂OH, 200 μ L de 10 mmol L⁻¹ Fe(III) preparado em 0,66 mol L⁻¹ HNO₃, 200 μ L de etanol e 60 s de reação para formação do hidroxamato. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



Foi avaliado o efeito do volume da solução de 10 mmol L⁻¹ Fe(III) preparada em 0,65 mol L⁻¹ HNO₃ com a finalidade de otimizar conjuntamente a quantidade de Fe(III) e a acidez necessária para evitar a precipitação de Fe(OH)₃ e para favorecer a formação do complexo. O efeito predominante foi a diminuição dos sinais analítico e do branco devido à menor formação do Fe(OH)₃ e, consequentemente, menor espalhamento de radiação (Figura 16). Isso ocorreu porque, apesar do aumento da concentração de Fe(III) no meio, aumentou concomitantemente a concentração de ácido. Assim, o volume de 175 µL foi selecionado por já fornecer as quantidades adequadas de Fe(III) e a acidez necessária.
Figura 16- Efeito do volume de solução de 10 mmol L⁻¹ Fe(III) preparada em 0,65 mol L⁻¹ HNO₃ sobre os sinais analítico (a) e do branco (b). Condições experimentais: 20 μ L de biodiesel (diluição 1:20 (v/v) em etanol), 20 μ L de 0,60 mol L⁻¹ NH₂OH, 400 μ L de 0,30 mol L⁻¹ NaOH, 200 μ L de etanol e 60 s de reação. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



O efeito do volume de biodiesel, diluído 1:10 (v/v) em etanol, foi avaliado com a finalidade de alcançar a sensibilidade adequada para as medidas analíticas (Figura 17). O sinal analítico aumentou gradativamente com o volume de amostra, indicando que havia um excesso de hidroxilamina e Fe(III). Volumes maiores que 40 μ L não foram avaliados para evitar riscos de separação de fases e também porque a sensibilidade necessária para as medidas já tinha sido alcançada. Assim, escolheu-se trabalhar com 40 μ L de biodiesel, que gerou a maior resposta analítica dentro do intervalo avaliado.

Figura 17- Efeito do volume de biodiesel sobre os sinais analítico (a) e do branco (b). Condições experimentais: 20 μ L de 0,60 mol L⁻¹ hidroxilamina, 175 μ L de 10 mmol L⁻¹ Fe(III) preparado em 0,65 mol L⁻¹ HNO₃, 300 μ L de 0,30 mol L⁻¹ NaOH, 200 μ L de etanol e 60 s de reação. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



Foi avaliado o efeito do tempo de residência (parada de fluxo) sob a reação entre os ésteres alquilícos e hidroxilamina, com a finalidade de trabalhar com o menor tempo de reação. Como mostra a Figura 18 houve um aumento gradativo no sinal analítico em função do tempo de reação. Devido à temporização reprodutível inerente aos procedimentos analíticos em fluxo, não foi necessário alcançar a condição de estado estacionário. Escolheu-se, dessa forma, trabalhar com 75 s de parada fluxo, como um compromisso entre resposta analítica e frequência de amostragem. **Figura 18-** Efeito do tempo de residência para a reação entre os ésteres metílicos e a hidroxilamina sobre os sinais analítico (a) e do branco (b). Condições experimentais: 40 μ L de biodiesel, 20 μ L de 0,60 mol L⁻¹ hidroxilamina, 175 μ L de 10 mmol L⁻¹ Fe(III) preparado em 0,65 mol L⁻¹ HNO₃, 300 μ L de 0,30 mol L⁻¹ NaOH, 200 μ L de etanol. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



4.3.3. Otimização (procedimento para a determinação de biodiesel na mistura biodiesel:diesel)

A quantidade de biodiesel na mistura biodiesel:diesel pode ser determinada medindo o teor de ésteres, que são espécies características do biodiesel [78]. Devido à menor miscibilidade do diesel no meio, observou-se turvação quando uma amostra da mistura foi processada sob as condições anteriores otimizadas para determinar o teor de éster em biodiesel. Essa desvantagem foi contornada pela adição de mais etanol ao meio (Tabela 8, etapa 5) e aumentando a diluição da amostra em etanol. Foi observado experimentalmente que pelo menos 500 µL de etanol adicional e uma diluição de *ca.* 15 vezes da amostra foram necessários para evitar a turbidez. Essa mínina diluição foi fixada para minimizar o impacto sobre a sensibilidade das medidas. Algumas estratégias foram adotadas para compensar a diminuição da sensibilidade: aumento do volume da amostra e do tempo de reação para 100 µL e 120 s, respectivamente. Com tempos de reação maiores que 120 s, houve um aumento pouco significativo da sensibilidade (*e.g.* apenas 5% para 300 s de reação). Resultados semelhantes foram obtidos para diferentes misturas de

biodiesel:diesel (por exemplo, S10 de cor amarela e S500 vermelha). Devido às diluições da amostra de *ca.* 15 vezes, foi possível analisar as amostras S500, sem interferência da sua cor.

4.3.4. Características analíticas

Após a otimização, respostas lineares foram obtidas nos intervalos 4,0-99 e 2,0-40% (v/v) de linoleato de metila para quantificar o teor de éster em biodiesel e na mistura biodiesel: diesel, respectivamente. As curvas de calibração são descritas pelas equações A = 0,342 + 0,00305C (r = 0,997) e A = 0,144 + 0,00503 C (r = 0,999), respectivamente. A sensibilidade foi 65% superior para a mistura biodiesel:diesel devido ao maior volume de amostra e tempo de reação utilizados, confirmando a eficácia das estratégias adotadas. O coeficiente de variação, o limite de detecção e a frequência de amostragem foram estimados em 0,80% (n =10), 0.36% (v/v) e 15 h⁻¹ para biodiesel, enquanto os valores correspondentes para a mistura biodiesel:diesel foram 0,2% (n = 10), 0,03% (v/v) e 12 h⁻¹, respectivamente. Foram consumidos apenas 40 µL de biodiesel e 100 µL da mistura biodiesel:diesel, diluídos 1:20 е 1:15 (v/v)em etanol. 0.860 mq de hidroxilamina. 0,175 mg de ferro e gerados ca. 3 mL de resíduo por determinação. Esses valores correspondem a menos de 1% do consumo de amostra e metade da quantidade de resíduo gerado pelo método oficial (EN 14103) para a determinação de ésteres em biodiesel [74].

Para avaliar se o linoleato de metila (éster formado predominantemente na reação de transesterificação de óleo de soja) poderia ser usado como uma espécie modelo para a estimativa do teor de éster em amostras de biodiesel provenientes de diferentes fontes, foram analisadas amostras diluídas 1:20 (v/v) em etanol, produzidas a partir de óleo de soja, óleo de algodão e gordura animal, com teores de éster 99% (v/v), determinado pelo método oficial. Os sinais foram comparados com os obtidos com o padrão de linoleato de metila (99% (v/v)) e apresentaram uma diferença de somente 3,0%, que foi considerada não significativa, indicando que o linoleato de metila pode ser o éster modelo e que a determinação de éster pode ser feita por calibração externa. Além disso, este fato indica que nem a reatividade do analito presente em diferentes matrizes com a hidroxilamina, e nem a absortividade

molar do complexo monitorado é significativamente afetada pelo substituinte do éster (grupo R na equação 4).

Com a finalidade de tornar o procedimento mais prático e rápido, foi avaliada a possibilidade de construir uma curva de calibração com diluições em linha (0-100%), de uma solução estoque de linoleato de metila (99% (v/v) em etanol). O coeficiente angular (305 ± 7) mg L⁻¹ foi concordante com a inclinação da curva de calibração construída com padrões de ésteres (338 ± 9) mg L⁻¹, tornando possível a construção da curva de calibração com diluições em linha de uma solução estoque de linoleato de metila. Isso é interessante para análises *in situ* e em outras situações em que a recalibração periódica é necessária.

Para avaliar a exatidão, foram analisadas algumas amostras de biodiesel produzidas a partir de diferentes matérias-primas e da mistura biodiesel:diesel pelos procedimentos proposto e oficiais. Esses são baseados em cromatografia gasosa para determinar o teor de éster em biodiesel (EN14103) [74] e espectroscopia NIR para quantificar biodiesel em diesel (EN14078) [73]. Os resultados são apresentados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Para avaliar a exatidão, os valores médios foram comparados pelo test *t* pareado e os valores obtidos (0,26 para biodiesel e 0,32 para mistura biodiesel:diesel) foram abaixo do valor crítico (2,57 e 2,44), indicando que os resultados são concordantes a nível de 95% de confiança.

Os resultados para as misturas também foram coerentes com o limite estabelecido pela legislação brasileira, 7% (v/v) de biodiesel misturado ao diesel, porcentagem relativa ao período em que as amostras foram coletadas (março de 2017) [3,4].

Biodiesel	Teor		
(matéria-prima)			
	Proposto	Referência [74]	**F _{calculad}
		c	
100% soja	96 ± 3	97 ± 3	1,0
90% soja / 10% algodão	96 ± 3	97 ± 3	1,0
90% soja / 10% sebo	98 ± 3	97 ± 3	1,0
70% soja / 30% sebo	96 ± 1	99 ± 3	9,0
100% soja	96 ± 1	98 ± 3	9,0
93% soja / 5% algodão / 2% sebc	97 ± 3	97 ± 3	1,0

Tabela 9- Teores de éster das amostras de biodiesel analisadas pelos procedimentos proposto e de referência

*Média \pm desvio padrão (n = 3); **F_{crítico} = 19 (95% de confiança)

Tabela	10-	Teores	de	biodiesel	na	mistura	biodiesel:diesel	determinados	pelos
procedimentos proposto e de referência									

Biod		
Proposto	Referência [73]	**F _{calculado}
6,6 ± 0,1	6,9±0,3	9,0
6,1 ± 0,1	6,7±0,3	9,0
$6,6 \pm 0,1$	$6,8\pm0,3$	9,0
$7,6 \pm 0,2$	7,7±0,3	2,2
$6,9 \pm 0,2$	6,6±0,2	1,0
$6,0 \pm 0,1$	$6,9\pm 0,3$	9,0
$6,3 \pm 0,1$	6,6± 0,2	4,0
	Biod Proposto $6,6 \pm 0,1$ $6,1 \pm 0,1$ $6,6 \pm 0,1$ $7,6 \pm 0,2$ $6,9 \pm 0,2$ $6,0 \pm 0,1$ $6,3 \pm 0,1$	Biodiesel % (v/v)* Proposto Referência [73] $6,6 \pm 0,1$ $6,9 \pm 0,3$ $6,1 \pm 0,1$ $6,7 \pm 0,3$ $6,6 \pm 0,1$ $6,8 \pm 0,3$ $7,6 \pm 0,2$ $7,7 \pm 0,3$ $6,9 \pm 0,2$ $6,6 \pm 0,2$ $6,0 \pm 0,1$ $6,9 \pm 0,3$ $6,3 \pm 0,1$ $6,6 \pm 0,2$

*Média ± desvio padrão (n = 3); **F_{crítico} = 19 (95% de confiança)

Algumas características analíticas de procedimentos utilizados para a determinação do teor de ésteres em biodiesel e na mistura biodiesel:diesel são apresentadas na Tabela 11. O coeficiente de variação do procedimento proposto para determinar biodiesel na mistura biodiesel:diesel significativamente melhor que os obtidos nos procedimentos que utilizam HPLC [75] e espectrofotometria em batelada, com detecção UV-vis [76,77]. O coeficiente de variação do procedimento proposto para determinar o teor de ésteres em biodiesel foi ca. 10 e 4 vezes menor que o método que utiliza cromatografia gasosa - espectrometria de massas (GC-MS, do inglês Gas Chromatography- Mass Spectrometry) [79] e HPLC-UV [75]. Essas características demonstram que o procedimento proposto é bastante preciso. O procedimento proposto utiliza etanol, um solvente menos tóxico quando comparado aos procedimentos alternativos que utilizam hexano [75,80], heptano [76] e 2-propanol [77]. O consumo de solvente no procedimento proposto para a determinação do teor de éster em biodiesel é similar ao procedimento HPLC-UV [75] e ca. 4 vezes menor quando comparado ao que utiliza GC-MS [79]. O consumo de solvente orgânico no procedimento proposto para quantificar biodiesel na mistura biodiesel:diesel é ca. 5 que no procedimento que utiliza HPLC [80] e ca. 12300 vezes menor quando comparado ao procedimento com detecção UV-vis [77]. Assim, destaca-se que o procedimento proposto atende aos requisitos da química verde, por consumir solvente menos tóxico e pequenas quantidades de reagente e solvente [10].

Procedimento	Geração de resíduo (mL) ¹	Consumo de solvente orgânico (mL) ¹	CV (%)	Referência
Teor de éster em biodiesel				
HPLC-UV	>2	2,0 (2-propanol + hexano)	3,0	75
GC-MS	10	9,25 (hexano)	8,0	79
FIA-SP	3	2,2 (etanol)	0,80	Este trabalho
Biodiesel na mistura biodiesel:diesel				
HPLC	12	12,0 (hexano)	8,0	80
UV-vis (batelada)	17	10,0 (heptano)	4,0	76
UV-vis (batelada)	10	9,3 (heptano)	3,7	77
FIA-SP	3	2,2 (etanol)	0,20	Este trabalho

Tabela 11- Características analíticas dos procedimentos para a determinação do teor de éster em biodiesel puro e na mistura com o diesel

FIA-SP: Análise em fluxo com detecção espectrofotométrica; GC-MS: cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas; HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência; UV-Vis: Espectrofotometria ultravioleta-vísivel; ¹ por determinação

4.4. Conclusões

O procedimento desenvolvido para a determinação do teor de ésteres em biodiesel e na mistura biodiesel: diesel, utilizando sistema de análise em fluxo baseado no processo lab-in-syringe, utilizou apenas o etanol como solvente e permitiu a redução das quantidades consumidas de reagentes e amostra quando comparado com os procedimento alternativos. O procedimento, quando comparado ao método oficial, possui um atrativo que é a possibilidade de análises in situ, i.e. diretamente nas usinas produtoras de biodiesel, tanto para a determinação do teor de éster, como para monitorar o processo de produção do biodiesel. O linoleato de metila, disponível comercialmente como reagente analítico, pode ser usado como éster modelo para a calibração, visando à determinação do analito em amostras de biodiesel oriundas de diferentes matérias-primas (óleo de soja e algodão e gordura animal), além de ser possível a calibração por diluição em linha da solução estoque de linoleato. Foi possível analisar tanto amostras do diesel S10 e S500 de coloração avermelhada. Os resultados obtidos foram concordantes com os teores de ésteres determinados pelos métodos oficiais EN14103 e EN14078. Dessa forma, o procedimento proposto é uma alternativa aos métodos oficiais para a determinação do teor de éster em biodiesel e de biodiesel em mistura com diesel.

REFERÊNCIAS

¹ VIRMOND, E.; ROCHA J. D.; MOREIRA R. F. P. M.; JOSÉ H. J. Valorization of agroindustrial solid residues and residues from biofuel production chains by thermochemical conversion: a review, citing Brazil as a case study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 30, n. 30, p. 197–229, 2013.

² BIODIESEL.COM. **Biodiesel no Brasil**. Curitiba, 2006. Disponível em: http://www.biodieselbr.com/biodiesel/brasil/biodiesel-brasil.htm>. Acesso em: 14 jan. 2018.

³ COSTA, V. L.; KOVALESKI, J. L.; JUNIOR, P. P. A.; MATOS, E. A. S. A. A introdução do biodiesel na matriz energética brasileira: contextualização histórica e o processo de produção. **Revista Brasileira de Energia**, Rio de janeiro, v. 19, n. 2, p. 71–89, 2013.

⁴ KNOTHE, G. Review: Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 88, n. 7, p. 669–677, 2007.

⁵ KNOTHE, G. Analyzing biodiesel: Standards and other methods. National Center for Agricultural Utilization Research. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 83, n. 10, p. 823–833, 2006.

⁶ AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL – ANP. **Biocombustíveis**. Informações de mercado. Brasília, DF, 2017. Disponível em: http://www.anp.gov.br/wwwanp/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado. Acesso em: 14 jan. 2018.

⁷ AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL – ANP. **Biocombustíveis**. Resultado dos leilões. Brasília, DF, 2018. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/distribuicao-e-revenda/leiloes-de-biodiesel/leiloesde-biodiesel-interna>. Acesso em: 14 jan. 2018.

⁸ POTENCIAL BIODIESEL. Brasil é o segundo maior produtor e consumidor de biodiesel. Lapa, PR, 2016. Disponível em: http://www.potencialbiodiesel.com.br/noticia/brasil-e-o-segundo-maior-produtor-e-consumidor-de-biodiesel/. Acesso em: 14 jan. 2018.

⁹ MONTEIRO, J. M. G.; LA ROVERE, E. L. **Plantio de oleaginosas para produção de biodiesel como estratégia de adaptação às mudanças climáticas**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2010. 43 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 157). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/36509/1/Bol-PD-157.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2018.

¹⁰ AMAIS, R. S.; TEIXEIRA, L. S. G.; ROCHA, F. R. P. Greener procedures for biodiesel quality control. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 7, n. 11, p. 4396-4418, 2015.

¹¹ CALLIS, J. B.; ILLMAN, D. L.; KOWALSKI, B. R. Process analytical-chemistry. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 59, n. 9, p. 624, 1987.

¹² CHAUVEL, J. P.; HENSLEE, W. W.; MELTON, L. A. Teaching process analytical chemistry. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 74, n. 13, p. 380-384, 2002.

¹³ WILLIAMS, D.; PAPPAS, G. Rapid identification of nerve agents sarin (GB) and soman (GD) with the use of a field-portable GC/SAW vapor detector and liquid desorption front-end device. **Field Analytical Chemistry and Technology**, New York, v. 3, n. 1, p. 45-53, 1999.

¹⁴ ALDSTADT, J. H.; OLSON, D. C.; WOLCOTT, D. K.; MARSHALL, G. D.; SZOSTEK, B.; MARTIN. A. F. Determination of Lewisite in the environment using a field-portable monitor. **Papers of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 214, n. 1, p. 130, 1997. Abstract.

¹⁵ STEC, K.; BOBROWSKY, A.; KALCHER, K.; MODEREGGER, H.; GOESLLER, W. Determination of arsenic in dolomites with a simple field spectrometric device. **Microchimica Acta**, Vienna, v. 153, n. 1-2, p. 45-49, 2006.

¹⁶ KNOTHE, G. Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v. 44 n. 2, p. 193-200, 2001.

¹⁷ CVENGROS, J.; CVENGROSOVA, Z. Quality-control of rapeseed oil methyl-esters by determination of acyl conversion. **Journal of the American Oil Chemists Society,** Champaign, v. 71, n. 12, p. 1349-1352, 1994.

¹⁸ FREEDMAN, B.; KWOLEK, W. F.; PRYDE, E. H. Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capillary gas-chromatography. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 63, n. 10, p. 1370-1375, 1986.

¹⁹ FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; KWOLEK, W. F. Thin-layer chromatography flame ionization analysis of transesterified vegetable-oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 61 n. 7, p. 1215-1220, 1984.

²⁰ ARZAMENDI, G.; ARGUIÑARENA, E.; CAMPO, I.; GANDÍA, L. M. Monitoring of biodiesel production: Simultaneous analysis of the transesterification products using size-exclusion chromatography. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 122, n. 1-2, p. 31-40, 2006.

²¹ PALOU, A.; MIRÓ, A.; BLANCO, M.; LARRAZ, R.; GÓMEZ, J. F.; MARTÍNEZ, T.; GONZÁLEZ, J. M.; ALCALÀ, M. Calibration sets selection strategy for the construction of robust PLS models for prediction of biodiesel/diesel blends physico-chemical properties using NIR spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Kidlington, v. 180, p. 119–126, 2017.

²² RIBEIRO, M. S.; ROCHA, F. R. P. A single-phase spectrophotometric procedure for in situ analysis of free glycerol in biodiesel. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 106, p. 23–26, 2013.

²³ NOBREGA, J. A.; TREVIZAN, L. C. , ARAUJO, G. C. L.; NOGUEIRA, A. R. A. Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. **Spectrochimica Acta Part B**, Kidlington, v. 57, n. 12, p. 1855–1876, 2002.

²⁴ BRANCALION, M. L.; ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of medicinal plant decomposition efficiency using microwave ovens and mini-vials for Cd determination by TS-FF-AAS. **Microchimica Acta**, Vienna, v. 150, n. 3-4, p. 150-283, 2005.

²⁵ NOMURA, C. S.; SINKUS, F. H.; OLIVEIRA, P. V. Micro vials adapted to focused microwave-assisted oven: an alternative to improve the sample digestion capability. In: TRENDS IN SAMPLE PREPARATION, 2004, Graz, Austria. **Development and application; book of abstracts**. Graz, Austria, 2004. p. 75.

²⁶ ZAGATTO, E. A. G., OLIVEIRA, TOWNSHEND, C. C., A., WORSFOLD, P. J. Flow analysis with spectrophotometric and luminometric detection, **Elsevier**, Amsterdam, p. 471, 2012.

²⁷ SILVESTRE, C. I. C.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; ZAGATTO, E. A. G. Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 652, n. 1-2, p. 54-65, 2009.

²⁸ RUZICKA J.; MARSHALL, G. D. Sequencial injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 237, n. 2, p. 229–343, 1990.

²⁹ TROJANOWICZ, M. (Ed.). **Advances in flow analysis**. Weinheim: Wiley – VCH, 2008.

³⁰ RUZICKA, J. From continuous flow analysis to programmable flow injection techniques. A history and tutorial of emerging methodologies. **Talanta**, Amsterdam, v. 158, p. 299–305, 2016.

³¹ GIIBELI, T.; CHRISTIAN, G. D.; RUZICKA, J. Fundamentals of Sinusoidal Flow Sequential Injection Spectrophotometry. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 63, n. 21, p. 2407–2413, 1991.

³² ZAGATTO, E. A. G.; ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. Detecting and circumventing sources of inaccuracy in flow analysis. **Pure and Applied Chemistry**, Research Triangle Park, v. 73, n. 1, p. 45–54, 2001.

³³ MAYA, F.; HORSTKOTTE, B.; ESTELA, J. M.; CERDÀ, V. Automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Kidlington, v. 59, p. 1-8, 2014.

³⁴ FRIZZARIN, R. M.; PORTUGAL, L. A.; ESTELA, J. M.; ROCHA, F. R. P.; CERDÀ, V. On-line lab-in-syringe cloud point extraction for the spectrophotometric determination of antimony, **Talanta**, Amsterdam, v. 148, p. 694-699, 2016.

³⁵ FEIGL, F.; ANGER, V. **Spot tests in organic analysis**. 7. ed. Amsterdam: Elsevier, 1966.

³⁶ MICHAEL, A. Z.; STEWART, M. S. The paper spot test: a rapid method for quantitating stannous concentrations in radiopharmaceutical kits. **Journal of. Nuclear Medicine**, Reston, v. 22, n. 5, p. 465–467, 1981.

³⁷ CHEN, K. C. S.; CHEN, L.; CHEN, L.; LIN, J. Y. Fluorescent spot test method for specific detection of β-lactames. **Analytical Biochemistry**, Seattle, v. 219, n. 1, p. 53–60, 1994.

³⁸ TUBINO, M.; BIANCHESSI, L. F.; CARVALHO, M. M. D. Quantitative spot test analysis of metformin in pharmaceutical preparations using ultraviolet-visible diffuse reflectance spectroscopy. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 26, n. 1, p. 121–124, 2010.

³⁹ CHENG, D.; ZHANG, X.; LI, X.; HOU, L.; WANG, C. Determination of aluminum in edible jelly fish using chrome azurol S with spot test on filter paper. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 33, n. 2, p. 185–189, 2017.

⁴⁰ OLIVEIRA, M.; FRANCO, K.; SUAREZ, W. T.; SANTOS, V. B. Digital image method smartphone-based for furfural determination in sugarcane spirits. **Food Analytical Methods**, New York, v. 10, n. 2, p. 508–515, 2017.

⁴¹ DAR, A.; SHAFIQUE, U.; ANWAR, J.; ZAMAN, W.; NASEER, A. A simple spot test quantification method to determine formaldehyde in aqueous samples. **Journal of Saudi Chemical Society**, Riyadh, Saudi Arabia, v. 20, n. 1, p. 352–356, 2016.

⁴² GORLAS, A.; GESLIN, C. A simple procedure to determine the infectivity and host rangeof viruses infecting anaerobic and hyperthermophilic microorganisms. **Extremophiles**, Japan, v. 17, n. 2, p. 349–355, 2013.

⁴³ MORAIS, C. L. M.; NEVES, A. C. O. MENEZES, F. G.; LIMA, K. M. G. Determination of serum protein content using cell phone image analysis. **Analytical Methods**. Cambridge, v. 34, n. 8, p. 6458–6462, 2016.

⁴⁴ ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; LEITE, O. D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidas e em um procedimento de purificação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 731–734, 2008.

⁴⁵ COLZANIA, H. R.; QUETHELEN, E. A. G.; FOGAÇA, C.; GELINSKI, J. M. L. N.; FILHO, E. R. P.; BORGESA, E. M. Determinação de fosfato em refrigerantes utilizando um scanner de mesa e análise automatizada de dados: um exemplo didático para ensino de química. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, n. 7, p. 833–839, 2017.

⁴⁶ GOMES, M. S.; TREVIZAN, L. C.; NÓBREGA, J. A. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1577–1581, 2008.

⁴⁷ YANG, X.; PIETY, N. Z.; VIGNES, S. M.; BENTON, M. S.; KANTER, J.; SHEVKOPLYAS, S. S. Simple paper-based test for measuring blood hemoglobin concentration in resource-limited settings. **Clinical Chemistry**, Washington, DC, v. 59, n. 10, p. 1506–1513, 2013.

⁴⁸ OLIVEIRA, K. A.; DAMASCENO, D.; OLIVEIRA, C. R.; SILVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. E.; COLTRO, W. K. T. Dengue diagnosis on laser printed microzones using smartphone-based detection and multivariate image analysis. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 8, n. 35, p. 6506–6511, 2016.

⁴⁹ CAMARGO, C. L.; VICENTINI, M. B. R.; GOBB, I. A. L., MARTINE, Z. D. S. T.; LIMA, R. S. Smartphone for point-of-care quantification of protein by Bradford assay. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 689-693, 2017.

⁵⁰ THANAKIATKRAI, P.; YAODAM, A.; KITPIPIT, T. Age estimation of bloodstains using smartphones and digital image analysis. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 233, p. 288–297, 2013.

⁵¹ HELFER, G. A.; MAGNUS, V. S.; BÖCK, F. C.; TEICHMANN, A.; FERRÃO, M. F., COSTA, A. B. PhotoMetrix: an application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 328–335, 2017.

⁵² WORLD ENERGY COUNCIL. Conseil Mondial de L'énergie for sustainable energy. London, 2010. 668 p.

⁵³ INSTITUTE OF SHORTENING AND EDIBLE OILS. Technical Committee. **Food fats and oils**. 10. ed. Washington, DC, 2016. 30 p.

⁵⁴ NATURAL PRODUCTS INSIDER. **Reinventing oil stability**. Phoenix, 2007. Disponível em: https://www.naturalproductsinsider.com/articles/2007/05/reinventing-oil-stability.aspx?topic=ph>. Acesso em: 15 ago. 2017.

⁵⁵ DIAS, L. A. S. Biofuel plant species and the contribution of genetic improvement. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 1, p. 16–26, 2011.

⁵⁶ WRIGHT, H. J.; SEGUR, J. B.; CLARK, H. V.; COBURN, S. K.; LANGDON, E. E.; DUPUIS, R. N. A report on ester interchange. **Oil & Soap**, Philadelphia, v. 21, p. 145–147, 1944.

⁵⁷ LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1596–1608, 2009.

⁵⁸ AKOH, C. C. Oxidative stability of fat substitutes and vegetable oils by the oxidative stability index method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 71, n. 2, p. 211–216, 1994.

⁵⁹ FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Oxidative stability of biodiesel from soybean oil fatty acid ethyl esters. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 3, p. 291–295, 2005.

⁶⁰ HOEKMAN, S. K.; BROCH, A.; ROBBINS, C.; CENICEROS, E.; NATARAJAN, M. Review of biodiesel composition, properties and specifications. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, London, v. 16, n. 1, p. 143–169, 2012.

⁶¹ BARABÁS, I.; TODORUŢ, I. A. Biodiesel - quality, standards and properties. In: MONTERO, G.; STOYTCHEVA, M. (Ed.). **Biodiesel - quality, emissions and byproducts**. Rijeka, Croatia: InTech, 2011. p. 1–28.

⁶² ARICETTI, J. A.; MACIEL, A. J. S.; LOPES, O. C.; TUBINO, M. A simple green method for biodiesel iodine number determination. **ASTM International**, West Conshohocken, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2010.

⁶³ TUBINO, M.; ARICETTI, J. A. A green potentiometric method for the determination of the iodine number of biodiesel. **Fuel**, London, v. 103, p. 1158–1163, 2013.

⁶⁴ BALABIN, R. M.; SAFIEVA, R. Z. Near-infrared (NIR) spectroscopy for biodiesel analysis: fractional composition, iodine value, and cold filter plugging point from one vibrational spectrum. **Energy Fuel**, Washington, DC, v. 25, n. 5, p. 2373–2382, 2011.

⁶⁵ SARPAL, A. S.; SILVA, S. R.; SILVA, P. R. M.; MONTEIRO, T. V.; ITACOLOMY, J.; CUNHA, V. S.; DARODA, R. J. Direct method for the determination of the iodine value of biodiesel by quantitative nuclear magnetic resonance (q1H NMR) spectroscopy. **Energy Fuel**, Washington, DC, v. 29, n. 12, p. 7956–7968, 2015.

⁶⁶ OLIVEIRA, A. D.; FILHO, J. G. P.; STRAGEVITCH, L.; CARVALHO, R. S. L.; BARROS, I. S. Biodiesel do óleo de pinhão manso degomado por esterificação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 36–40.

⁶⁷ SHIMAMOTO, G. G.; ARICETTI, J. A.; TUBINO, M. A simple, fast and green titrimetric method for the determination of the iodine value of vegetable oils without wijs solution (ICI). **Food Analytical Methods**, New York, v. 9, n. 9, p. 2479–2483, 2016.

⁶⁸ SATO, R. T.; STROPPA, P. H. F.; SILVA, A. D.; OLIVEIRA, M. A. L. Fast GC–FID method for monitoring acidic and basic catalytic transesterification reactions in vegetable oils to methyl ester biodiesel preparation. **Química Nova**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 352–355, 2016.

⁶⁹ CANAKCI, M.; GERPEN, J. V. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v. 44, n. 6, p. 1429–1436, 2003.

⁷⁰ AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Resolução ANP nº 45 de 25 de agosto de 2014. Dispõe sobre a especificação do biodiesel contida no Regulamento Técnico ANP nº 3 de 2014 e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, de 26 ago. 2014.

⁷¹ BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **BS EN 14111:2003**. Fat and oil derivatives. Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of iodine value – Volumetric titration. London, 2003. 12 p.

⁷² FERREIRA, A. C.; KORN, M. G. A.; FERREIRA, S. L. C. Multivariate optimization in preconcentration procedure for manganese determination in seawater samples by FAAS. **Microchimica Acta**, Vienna, v. 146, n. 3-4, p. 271–278, 2004.

⁷³ EUROPEAN STANDARD. **EN 14078**, Liquid petroleum products – Determination of fatty methyl ester (FAME) content in middle distillates – Infrared spectrometry method. Pilsen, Czech Republic, 2014.

⁷⁴ EUROPEAN STANDARD. **EN 14103**, Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. Pilsen, Czech Republic, 2011.

⁷⁵ CARVALHO, M. S.; MENDONÇA, M. A.; PINHO D. M. M.; RESCK, I. S.; SUAREZ, P. A. Z. Chromatographic analyses of fatty acid methyl esters by HPLC-UV and GC-FID. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 763–769, 2012.

⁷⁶ SILVA, M. A. A.; CORREA, R. A.; TAVARES, M. G. O.; FILHO, N. R. A. A new spectrophotometric method for determination of biodiesel content in biodiesel/diesel blends. **Fuel**, London, v. 143, p. 16–20, 2015.

⁷⁷ ZAWADZKI, A.; SHRESTHA, D. S.; HE, B. Biodiesel blend level detection using ultraviolet absorption spectra. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v. 50, n. 4, p. 1349–1353, 2007.

⁷⁸ RASHED, M. M.; KALAM, M. A.; MASJUKI, H. H.; RASHEDUL, H. K.; ASHRAFUL, A. M.; SHANCITA, I., RUHUL, A. M. Stability of biodiesel, its improvement and the effect of antioxidant treated blends on engine performance and emission. **RSC Advances**, Cambridge, v. 5, n. 46, p. 36240–36261, 2015.

⁷⁹ PARDO, V. L.; FAGUNDES, C. A. M.; CALDAS, S. S.; KURZ, M. H.; CLEMENTIN, R. M.; D'OCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G. Development and Validation of a Method for the Determination of Fatty Acid Methyl Ester Contents in Tung Biodiesel and Blends. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 89, n. 4, p. 631– 637, 2012.

⁸⁰ FOGLIA, T. A.; JONES, K. C.; PHILLIPS, J. G. Determination of biodiesel and triacylglycerols in diesel fuel by LC. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 62, n. 3-4, p. 115–119, 2005.