



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

ALYSSON VASQUES FERNANDES SAKO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE  
MÚLTIPLOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE BIODIESEL POR  
ELETROFORESE CAPILAR POR DETECÇÃO POR UV**

FLORIANÓPOLIS

2019

Alysson Vasques Fernandes Sako

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE MÚLTIPLOS  
PARÂMETROS DE QUALIDADE DE BIODIESEL POR ELETROFORESE  
CAPILAR POR DETECÇÃO POR UV**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em  
Química da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do título de doutor em  
química.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra

Sako, Alysson Vasques Fernandes  
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE MÚLTIPLOS  
PARÂMETROS DE QUALIDADE DE BIODIESEL POR ELETROFORESE  
CAPILAR POR DETECÇÃO POR UV / Alysson Vasques Fernandes  
Sako ; orientador, Gustavo Amadeu Micke, 2019.  
110 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,  
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. Eletroforese Capilar. 3. Biodiesel. 4.  
Parâmetros de Qualidade. 5. cátions, glicerina, índice de  
iodo. I. Amadeu Micke, Gustavo . II. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.  
Titulo.

Alysson Vasques Fernandes Sako

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE MÚLTIPLOS  
PARÂMETROS DE QUALIDADE DE BIODIESEL POR ELETROFORESE  
CAPILAR POR DETECÇÃO POR UV**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Fernando Gustavo Tonin, Dr.  
Universidade de São Paulo

Prof.a Alessandra Vincenzi Jager, Dra.  
Universidade de São Paulo

Prof.a Tatiane de Andrade Maranhão, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Química.

---

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado  
Coordenador do Programa

---

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke  
Orientador

Florianópolis, 17 de julho de 2019.

Este trabalho é dedicado aos meus colegas de classe e aos meus queridos pais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela inteligência e sabedoria. A porta que o Senhor abre nunca será fechada, a menos que seja de sua vontade. Agradeço por ter encontrado essa porta aberta e ter vencido mais uma etapa. Em um mundo onde a ciência é um cadeado, conhecer o portador da chave faz toda diferença.

Agradeço aos meus pais por todo empenho, dedicação e atenção dados a mim. Certamente que as colunas que sustentaram a ponte sobre a qual andei para atravessar um oceano cheio de problemas foram vocês.

Meu mais querido agradecimento a Milene Felix da Silva por ser os ouvidos que escutam minhas alegrias e lamentações, a boca que fala palavras de afeto, apoio e ânimo quando mais preciso, e os olhos que avistam um futuro onde eu desejo estar.

Por todos os anos que passei no LABEC e pelos momentos de discussão científica, ora na tranquilidade, ora no desespero, e pelo convívio agradável e sem hostilidade, agradeço ao meu orientador Gustavo Micke. Aproveitando o “*link*”, também agradeço a Lizandra, primeira dama do LABEC, por ter acompanhado de perto a batalha histórica do LABEC contra o biodiesel.

Pela participação direta ou indireta no trabalho, meus agradecimentos a: Daniel Spudeit, Diogo Siebert, Victor Rodrigues, Samantha Gonçalves, Vitor Debatin, Waldemar Pacheco (ANP), prof.a Tatiane Saint’Pierre (PUC-Rio), Maurício Dupim (PUC-Rio), prof. Marcone Oliveira (UFJF) e também ao MAPA (Florianópolis) e a EPAGRI (Itajaí).

Agradeço aos queridos integrantes do LABEC. Acredito que o laboratório esteja atualmente no ápice do bom convívio entre os colegas e isso é totalmente mérito de vocês.

Agradeço aos professores dr. Fernando G. Tonin, dra. Alessandra V. Jager, dra. Tatiane Maranhão e dr. Marcel Piovezan por comporem a banca examinadora.

Agradeço ao CNPQ, órgão de fomento essencial para realização da pesquisa e desenvolvimento acadêmico e ao INCT, cuja infraestrutura disponibilizada foi determinante para o desenvolvimento do trabalho.

Por fim, agradeço a UFSC por ter sido vital para o meu crescimento intelectual e pessoal ao longo do tempo em que estudei aqui.

“Sucesso não é o final, fracasso não é fatal.  
A coragem para continuar é o que conta.”

Winston Churchill

## RESUMO

Métodos para determinação de sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{+2}$ ), glicerina livre (GL), glicerina total (GT) e índice de iodo em amostras de biodiesel por eletroforese capilar por detecção por UV foram desenvolvidos. Para determinação dos cátions, GL e GT foi utilizado um capilar de sílica de 52 cm de comprimento e o eletrólito de corrida para separação dos analitos foi composto por 60 mmol  $\text{L}^{-1}$  de ácido acético, 15 mmol  $\text{L}^{-1}$  de imidazol e 5 mmol  $\text{L}^{-1}$  de éter 18 - coroa - 6. Os limites de quantificação para os cátions variaram entre 0,5 mg  $\text{Kg}^{-1}$  a 0,07 mg  $\text{Kg}^{-1}$  e, para GT e GL, foram de 0,0056% (m/m) e 0,00056% (m/m) respectivamente. O eletroferograma gerado exibe quatro parâmetros de qualidade do biodiesel em aproximadamente 2,5 minutos. Como o método é indireto para análise de cátions, a concentração dos cátions também pode ser calculada sem curva de calibração, pois são utilizadas equações de razão de transferência e fator de conversão para cada cátion. De acordo com o teste-t, os valores encontrados por eletroforese capilar para os cátions, GL e GT são equivalentes aos valores obtidos por diversos laboratórios que utilizaram os métodos oficiais DIN EN14538, NBR 15553, NBR 15556, NBR 15908, ASTM D 6584 e NBR 15908. Um procedimento baseado na conversão do eletroferograma de tempo de migração para mobilidade efetiva também foi desenvolvido. Desvios de mobilidade efetiva entre quatro laboratórios diferentes foram inferiores a 1% (CV) com o procedimento desenvolvido. Para determinação do índice de iodo de amostras de biodiesel, foi utilizado um capilar de sílica com 48,5 cm de comprimento e eletrólito de corrida otimizado foi composto por ácido 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  de 6-aminocapróico e 10 mmol  $\text{L}^{-1}$  ácido clorídrico. O método foi validado utilizando curva de calibração externa e calibração de ponto único. De acordo com testes estatísticos realizados, concentrações de iodeto entre a faixa de 20 mg  $\text{L}^{-1}$  a 90 mg  $\text{L}^{-1}$  podem ser utilizados como referência de calibração de ponto único. O limite de quantificação calculado foi inferior a 1 g de  $\text{I}_2$  para 100 g de biodiesel. Em relação ao método oficial DIN EN 14111, o tempo de análise da amostra foi reduzido significativamente, pois o tempo de reação de Wijs foi melhorado de 30 para 3 minutos. De acordo com o teste-t, os valores de índice de iodo encontrados pelo método desenvolvido são equivalentes aos valores obtidos através do método oficial DIN EN 14111.

**Palavras-chave:** Biodiesel. Eletroforese Capilar. Cátions. Sódio. Potássio. Cálcio. Magnésio. Glicerina livre. Glicerina total. Índice de iodo.

## ABSTRACT

Methods for determination of sodium ( $\text{Na}^+$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ), calcium ( $\text{Ca}^{+2}$ ), magnesium ( $\text{Mg}^{+2}$ ), free glycerol (FG), total glycerol (TG) and iodine number in biodiesel samples by capillary electrophoresis with UV detection (CE-UV) were developed. The separation of cations, FG e TG was performed in a silica capillary (52 cm x 75  $\mu\text{m}$ ) using a background electrolyte (BGE) composed by 60  $\text{mmol L}^{-1}$  acetic acid, 15  $\text{mmol L}^{-1}$  imidazole and 5  $\text{mmol L}^{-1}$  18 – crown – 6. The LOQ for cations ranged from 0.5  $\text{mg Kg}^{-1}$  to 0.07  $\text{mg Kg}^{-1}$  and, for TG e FG, from 0.0056% (w/w) to 0.00056% (w/w), respectively. The electropherogram obtained exhibits four quality parameters of biodiesel in approximately 2.5 min. Whereas the method is indirect for cation analysis, the concentration of cations in biodiesel samples can be calculated through transfer ratio and conversion factor equations, and no calibration curve is necessary. However, the migration time of the peaks should be corrected. According to statistical t-test, the results obtained by CE-UV for cations, GL e GT are equivalent to the results obtained by the methods DIN EN14538, NBR 15553, NBR 15556, NBR 15908, ASTM D 6584 and NBR 15908. A procedure based on the conversion of the migration time axis of the electropherogram to effective mobility axis was also developed. Interlaboratorial migration time deviations were better than 1% RSD. The method for determination of iodine number of biodiesel samples by CE-UV was developed using a silica capillary (48.5 cm x 50  $\mu\text{m}$ ) and BGE composed by 50  $\text{mmol L}^{-1}$  6-aminocaproic and 10  $\text{mmol L}^{-1}$  HCl. The method was performed using both external calibration curve and single point calibration (SPC). According to statistical tests, concentration levels of 20  $\text{mg L}^{-1}$  to 90  $\text{mg L}^{-1}$  of I is the best range to perform the SPC. The LOQ for the proposed method is lower than 1 g of  $\text{I}_2$  per 100 g of biodiesel. Compared with the method DIN EN 14111, the analysis time was reduced significantly and the Wijs reaction time of was reduced from 30 to 3 min. According to statistical t-test, the iodine number of biodiesel samples obtained using the proposed method and the method DIN EN 14111 are equivalent with a confidence level of 95%.

**Keywords:** Biodiesel. Capillary Electrophoresis. Cations. Sodium. Potassium. Calcium. Magnesium. Free glycerol. Total glycerol. Iodine number.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação de transesterificação envolvendo moléculas de álcool e triacilglicerídeo. A reação produz o biodiesel e glicerol. ....	16
Figura 2: Eletroferograma obtido pelo método proposto por Spudeit em 2012. Analitos em azul são referentes a análise de GL e, em vermelho, são referentes a análise de GT.....	23
Figura 3: Reações envolvidas no método de Wijs (método EN 14111).....	24
Figura 4: Representação de um equipamento de CE com sistema de injeção hidrodinâmica e detecção por espectrometria de UV- VIS. ....	30
Figura 5: Representação do fluxo eletrosmótico. ....	33
Figura 6: Perfil dos picos com diferentes gradientes de velocidade relativa.....	35
Figura 7: Preparo de amostras para determinação de cátions em amostras de biodiesel. ....	44
Figura 8: Preparo de amostra para determinação de glicerina livre em amostras de biodiesel. ....	45
Figura 9: Preparo de amostra da glicerina total. ....	46
Figura 10: Fluxograma para cálculo da concentração dos cátions. ....	50
Figura 12: Processo de <i>Stacking</i> que ocorre devido rápido descolamento de íons $K^+$ , $H^+$ e $Cl^-$ . ....	52
Figura 13: Representação do capilar e os volumes de injeção estimados de cada amostra no método proposto. ....	53
Figura 14: Curvas de mobilidades efetivas ( $\mu_{eff}$ ) dos analitos vs pH. Para cálculo de $\mu_{eff}$ , não foram considerados efeitos de força iônica. ....	54
Figura 15: Eletroferogramas obtidos utilizando concentrações diferentes de 18 - coroa - 6. ...	56
Figura 16: Efeito produzido pela adição de $\beta$ -alanina à amostra que contém $HNO_3$ . ....	60
Figura 17: Efeito do ácido acético sobre a amostra de GT.....	62
Figura 18: Eletroferograma da análise da amostra interlaboratorial com o método proposto. ....	70
Figura 19: Curva de mobilidade efetiva do fluxo ( $\mu_{EOF}$ ) vs tempo de migração da etanolamina ( $t_{mET}$ ). ....	71
Figura 20: Eletroferogramas cujos eixos de tempo foram modificados para mobilidade efetiva. Seção referente às análises de GT e GL. ....	73
Figura 21: Eletroferogramas cujos eixos de tempo foram modificados para mobilidade efetiva. Seção referente às análises de cátions. ....	74
Figura 11: Preparo de amostra para determinação do índice de iodo em amostras de biodiesel. ....	83

Figura 22: Curva de mobilidades efetiva ( $\mu_{\text{eff}}$ ) vs pH para os analitos e componentes do eletrólito.....	87
Figura 23: Eletroferograma referente à análise da amostra interlaboratorial. ....	91
Figura 24: Distribuição dos resíduos em cada nível de concentração de $\Gamma$ .....	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição sucinta do método proposto por Spudeit em 2012 para determinação de $K^+$ , $Na^+$ , $Ca^{+2}$ e $Mg^{+2}$ , glicerina livre e total. ....	22
Tabela 2: Resumo detalhado das condições instrumentais e operacionais do método proposto. ....	47
Tabela 3: Valores de gradiente velocidade relativa ( $S_A$ ), mobilidade efetiva ( $\mu_{eff}$ ) e tempo de migração simulados no programa <i>Peakmaster 5.3</i> para os íons de interesse. ....	55
Tabela 4: Concentrações dos cátions encontrados em amostras certificadas. ....	58
Tabela 5: Concentrações de cátions encontradas em diferentes massas de biodiesel utilizando um volume fixo de 500 $\mu L$ de $HNO_3$ 30 $mmol L^{-1}$ como solvente extrator. ....	59
Tabela 6: Parâmetros de validação para o método desenvolvido. ....	64
Tabela 7: Valores de <i>Z-score</i> obtidos utilizando o método proposto em quatro laboratórios. ....	66
Tabela 8: Valores de concentração e precisão interlaboratorial obtidos através do método proposto. ....	66
Tabela 9: Valores de CV e <i>HorRat</i> para avaliar a repetibilidade de cada analista. ....	68
Tabela 10: Concentração de cátions, GT e GL encontrados em amostras utilizando o método proposto. ....	69
Tabela 11: Valores de mobilidade do fluxo eletrosmótico calculados a partir do tempo de migração da etanolamina ( $T_{mET}$ ). ....	72
Tabela 12: Tempos de migração e mobilidades efetivas dos analitos. ....	72
Tabela 13: Valores de fluxo eletrosmótico ( $\mu_{EOF}$ ) calculados através da equação 18. ....	74
Tabela 14: Valores médios de mobilidade efetiva dos analitos ( $\mu_{effA}$ ). ....	75
Tabela 15: Valores médios de razão de transferência ( $TR_{A:CO}$ ). ....	75
Tabela 16: Tempos de migração experimentais e corrigidos para os analitos e áreas dos picos. ....	76
Tabela 17: Concentração de cátions encontrados na amostra de referência através do método sem calibração. ....	77
Tabela 18: Comparação através do teste t entre valores obtidos e valores de referência. ....	78
Tabela 19: Semi-reações envolvidas na formação de I <sup>-</sup> e potenciais-padrão de redução. ....	86
Tabela 20: Parâmetros de otimização do eletrólito de corrida. ....	88
Tabela 21: Parâmetros de validação do método proposto utilizando formas de calibração diferentes. ....	89
Tabela 22: Índices de iodo calculados através do método proposto com CCE e CPU. ....	91

Tabela 23: Índices de iodo calculados através dos fatores de resposta obtidos em cada nível da curva. ....	93
Tabela 24: Comparação estatística (teste t) dos valores obtidos por CCE e CPU para cada nível de concentração de $\Gamma$ . ....	93
Tabela 25: Resultados do teste G para os resíduos de cada nível de concentração de $\Gamma$ .....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ANP – Agência nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
- APROBIO – Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil
- ASTM – *American Society for Testing and Materials* (Sociedade Americana de Testes e Materiais)
- BGE- *Background Electrolyte* (eletrólito de corrida)
- CCE – Curva de Calibração Externa
- CE – *Capillary Electrophoresis* ( Eletroforese Capilar)
- CEC – *Capillary Electrochromatography* (Eletrocromatografia Capilar)
- CEN – *Comité Européen de Normalisation* (Comitê Europeu de Normalização)
- CNPE – Conselho Nacional de Política Energética
- CPU – Calibração de Ponto Único
- CV – coeficiente de variação
- CZE – *Capillary Zone Electrophoresis* (Eletroforese Capilar de Zona)
- CZE – *UV Capillary Zone Electrophoresis with UV detection* (Eletroforese Capilar de Zona por detecção por UV)
- DIN – *Deutsches Institut für Normung* (Instituto alemão de normalização)
- EMD – *Electromigration by Dispersion* (Eletromigração por Dispersão)
- EOF – *Electroosmotic flow* (fluxo eletrosmótico)
- GL – Glicerina livre
- GT – Glicerina total
- HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de alta eficiência)
- IEF – *Isoelectric Focusing* (Focalização Isoelétrica)
- ISO – *International Organization for Standardization* (Organização internacional de normalização)
- LLE – Liquid-liquid extraction (extração líquido – líquido)
- LOD – *Limit of Detection* (Limite de detecção)
- LOQ – *Limit of Quantification* (Limite de detecção)
- MEKC – *Micellar Electrokinetic Chromatography* (Cromatografia Eletrocinética Micelar)
- NBR – Norma Brasileira
- RANP – Resolução da ANP
- $\mu_{\text{eff}}$  – mobilidade efetiva
- $\mu_{\text{EOF}}$  – mobilidade do fluxo eletrosmótico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1	BIODIESEL: IMPORTÂNCIA, SÍNTESE, E CONTROLE DE QUALIDADE .....	15
1.2	PRODUÇÃO DE BIODIESEL E IMPACTO ECONÔMICO.....	17
1.3	AVANÇOS NO CONTROLE DE QUALIDADE DE BIODIESEL .....	18
<b>1.3.1</b>	<b>Métodos para determinação de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> em biodiesel.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Métodos para determinação de GL e GT em biodiesel.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Método para determinação de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup> GL e GT por CE .....</b>	<b>22</b>
<b>1.3.4</b>	<b>Métodos para determinação do índice de iodo em amostras de biodiesel.....</b>	<b>24</b>
1.4	A PROPOSTA DO TRABALHO .....	25
1.5	ELETROFORESE CAPILAR .....	26
<b>1.5.1</b>	<b>Introdução da técnica.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Modalidades da eletroforese capilar.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5.3</b>	<b>Instrumentação da CE .....</b>	<b>28</b>
<b>1.5.4</b>	<b>Aspectos teóricos de separação por Eletroforese Capilar de Zona.....</b>	<b>30</b>
1.5.4.1	Mobilidades efetivas e aparentes .....	30
1.5.4.2	Fluxo eletrosmótico .....	32
1.5.4.3	Fatores que afetam a simetria de pico em CE.....	33
<b>1.5.5</b>	<b>Métodos indiretos por CE.....</b>	<b>35</b>
1.5.5.1	Método indireto para cálculo de concentrações sem calibração .....	36
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	39
<b>2.1.1</b>	<b>Objetivos Específicos para determinação de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, GT e GL em amostras de biodiesel por CZE-UV .....</b>	<b>39</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos para determinação do índice em amostras de biodiesel por CZE-UV.....</b>	<b>40</b>

<b>3</b>	<b>PARTE I- DETERMINAÇÃO DE Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, GL E GT EM AMOSTRAS DE BIODIESEL POR CZE-UV .....</b>	<b>41</b>
3.1	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	41
3.1.1	<b>Instrumentação .....</b>	<b>41</b>
3.1.2	<b>Padrões soluções e amostras .....</b>	<b>41</b>
3.1.3	<b>Otimização do eletrólito de corrida e condições operacionais do método.....</b>	<b>42</b>
3.1.4	<b>Otimização da extração dos cátions.....</b>	<b>43</b>
3.1.5	<b>Preparo de amostra da glicerina livre .....</b>	<b>44</b>
3.1.6	<b>Preparo de amostra da glicerina total .....</b>	<b>45</b>
3.1.7	<b>Condições instrumentais resumidas .....</b>	<b>46</b>
3.1.8	<b>Validação do método do método proposto.....</b>	<b>47</b>
3.1.9	<b>Método para transformação dos eletroferogramas em mobilidades efetivas ....</b>	<b>49</b>
3.1.10	<b>Método sem calibração para determinação de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> por CZE-UV.....</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
4.1	OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE INJEÇÃO DAS AMOSTRAS .....	51
4.2	OTIMIZAÇÃO DO ELETRÓLITO DE CORRIDA .....	53
4.3	ANÁLISE DE CÁTIOS.....	57
4.3.1	<b>Otimização da extração dos cátions.....</b>	<b>57</b>
4.3.2	<b>Preparo de amostra para injeção dos cátions .....</b>	<b>59</b>
4.4	ANÁLISE DA GLICERINA LIVRE .....	61
4.5	ANÁLISE DE GLICERINA TOTAL .....	61
4.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO E ANÁLISE DE AMOSTRAS .....	63
4.7	MÉTODO PARA TRANSFORMAÇÃO DOS ELETROFEROGRAMAS EM MOBILIDADES EFETIVAS.....	70
4.8	MÉTODO SEM CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>+2</sup> E Mg <sup>+2</sup> .....	74
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO DA PARTE I.....</b>	<b>79</b>

<b>6</b>	<b>PARTE II - DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE IODO EM AMOSTRAS DE BIODIESEL POR CZE-UV</b> .....	<b>81</b>
6.1	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	81
6.1.1	Instrumentação.....	81
6.1.2	Padrões, soluções e amostras.....	81
6.1.3	Otimização do eletrólito de corrida e condições operacionais do método.....	82
6.1.4	Preparo das amostras para determinação do índice de iodo.....	82
6.1.5	Validação do método.....	83
6.1.6	Programas para tratamentos de dados.....	84
<b>7</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>85</b>
7.1	ESTRATÉGIA DE ANÁLISE.....	85
7.2	OTIMIZAÇÃO DO ELETRÓLITO DE CORRIDA.....	86
7.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	88
7.4	ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	90
7.5	COMPARAÇÃO ENTRE CPU E CCE.....	92
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO DA PARTE II</b> .....	<b>99</b>
	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA PUBLICADA</b> .....	<b>100</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>101</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 BIODIESEL: IMPORTÂNCIA, SÍNTESE, E CONTROLE DE QUALIDADE

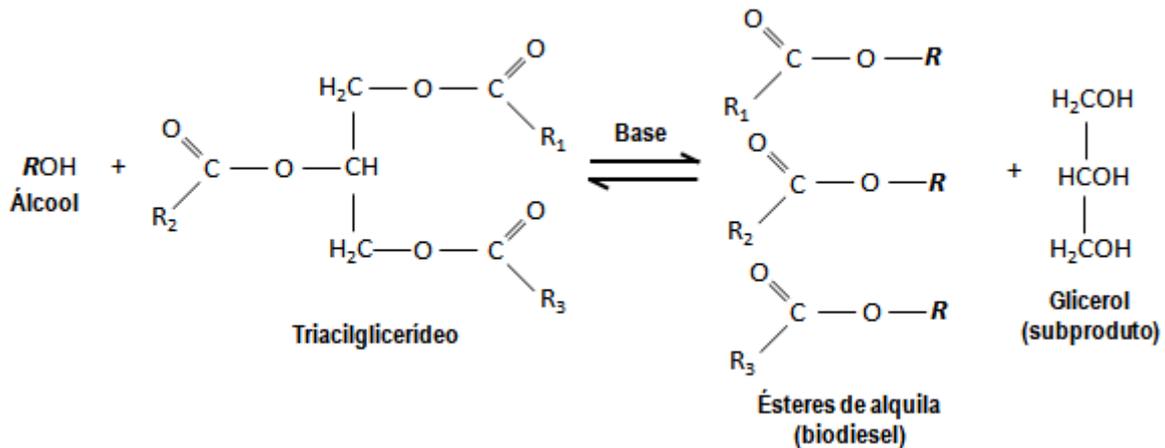
Existe uma grande demanda de combustível no mundo e o alto consumo de combustível fóssil intensifica a emissão de poluentes para a atmosfera e aumenta o efeito estufa. Para reduzir o consumo de combustíveis fósseis, pesquisas estão sendo realizadas para encontrar fontes de energia mais ecológicas e renováveis (CHUAH *et al.*, 2016, 2017). No setor de transportes, o biodiesel é um grande substituto para o petróleo, pois pode ser misturado com combustíveis fósseis para ser utilizado em motores movidos a diesel sem que nenhuma transformação mecânica seja necessária (OUANJI *et al.*, 2016). O biodiesel também pode ser aplicado como óleo de aquecimento, lubrificante, plastificante e absorvente de alto ponto de ebulição para limpar emissões industriais gasosas. O biocombustível apresenta melhor biodegradabilidade e menor toxicidade em comparação ao combustível fóssil (KNOTHE; RAZON, 2017). Vários tipos de óleos, novos ou já utilizados, de origem vegetal ou animal, podem ser utilizados para fabricação do biocombustível (BRENNAN; OWENDE, 2010; ENWEREMADU; MBARAWA, 2009; GASHAW; MOHAMMED, 2014; GASHAW; TESHITA, 2014; OUANJI *et al.*, 2016).

A produção de biodiesel em escala industrial é realizada através da transesterificação de triacilgliceróis, em uma reação que frequentemente é catalisada por bases, principalmente NaOH ou KOH. Para realizar a transesterificação, os solventes mais utilizados são metanol ou etanol. A reação produz monoésteres de alquila e, como maior subproduto, a glicerina (glicerol)(OUANJI *et al.*, 2016). A figura 1 é uma representação da reação que ocorre entre um álcool e um triacilglicerídeo para formar o biocombustível.

Diante da importância do biodiesel para a sociedade moderna, em 1991 a Áustria foi o primeiro país a estabelecer normas de controle de qualidade de biodiesel proveniente da reação utilizando metanol como reagente. Logo após, surgiram às normas da Alemanha (DIN 51606), da União Europeia (EN 14214) e dos Estados Unidos (ASTM D6751) (KNOTHE; RAZON, 2017; LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). O controle de qualidade de biodiesel no Brasil também é realizado através de normas estipuladas pela RANP 45 - 2014, que é a Resolução da ANP de nº 45 de 26 de agosto de 2014 (ANP, 2014). Dentre os parâmetros de

qualidade do biodiesel, serão discutidos os referentes às concentrações de Na, K, Ca, Mg, a glicerina livre (GL), a glicerina total (GT) e o índice de iodo, que são os parâmetros de interesse para esse trabalho.

Figura 1: Reação de transesterificação envolvendo moléculas de álcool e triacilglicerídeo. A reação produz o biodiesel e glicerol.



Fonte: O autor.

Como determinado pela resolução da ANP de 2014, estipula-se que as concentrações de  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{+2} + \text{Mg}^{+2}$  não devem ultrapassar  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  no biodiesel. Os metais alcalinos Na e K normalmente são encontrados no biodiesel, pois são adicionados na forma de hidróxidos para realização da catálise básica durante a produção do combustível (FERRARI; PIGHINELLI; PARK, 2011). Os metais alcalinos terrosos Ca e Mg normalmente são provenientes da água com o qual o biodiesel foi lavado após a sua produção (FERRARI; PIGHINELLI; PARK, 2011). A presença desses metais no biodiesel promove consequências indesejáveis. A decomposição do biodiesel é acelerada quando as concentrações dos metais são elevadas (AMAIIS *et al.*, 2012). Os filtros dos veículos também são entupidos devido à formação de sabão insolúvel (DE JESUS; SILVA; VALE, 2008). Pode também haver geração de cinzas dentro do motor devido à presença de Na e K no combustível (FERRARI; PIGHINELLI; PARK, 2011).

A GL e GT são outros dois parâmetros de qualidade que são controlados. A GL é referente à molécula de glicerina que foi liberada totalmente de um triacilglicerídeo quando a reação de transesterificação ocorreu (FERRARI; PIGHINELLI; PARK, 2011; SPUDEIT *et al.*, 2013). Concentrações elevadas de GL indicam que a lavagem do biodiesel foi insuficiente

(FERRARI; PIGHINELLI; PARK, 2011). Outra forma de glicerina é a forma ligada, onde a glicerina ainda pode estar na forma de mono-, di- ou triacilglicerídeo (FERRARI; PIGHINELLI; PARK, 2011; SPUDEIT *et al.*, 2013). Logo, a GT é a soma da glicerina livre mais a glicerina ligada. Uma quantidade elevada de glicerina ligada significa que a reação para produção de biodiesel não foi eficiente ou que o biodiesel foi adulterado com algum óleo vegetal. De acordo com a RANP - 45, as concentrações de GL e GT não devem ultrapassar 0,02% m/m (200 mg kg<sup>-1</sup>) e 0,25% m/m (2500 mg kg<sup>-1</sup>) respectivamente (ANP, 2014). Esses limites devem ser respeitados, pois a glicerina encontrada no biodiesel pode obstruir os filtros de combustível do veículo e também pode formar acroleína. A acroleína é um composto tóxico formado durante o processo de combustão e que inevitavelmente é liberado no meio ambiente (B. LIMA *et al.*, 2012). O excesso de GT e GL também pode formar depósitos de carbono sobre as superfícies do bico injetor, pistões e válvulas, prejudicando o funcionamento dos veículos (FERRARI; PIGHINELLI; PARK, 2011).

A resolução da RANP-45 também determina que os de índices de iodo das amostras devem ser anotados. Embora a RANP – 45 não estipule um limite máximo de índice de iodo, algumas normas europeias, como a EN 14214, estabelecem um consumo máximo de 120 g de I<sub>2</sub> para cada 100 g de biodiesel (LAPUERTA; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ; DE MORA, 2009; LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). O índice de iodo é um parâmetro que reflete o grau de insaturação do biodiesel e óleos vegetais. Quando o grau de insaturação do biodiesel é elevado, pode haver polimerização do biocombustível a altas temperaturas e a viscosidade do combustível aumenta. Consequentemente a lubrificação do bico injetor e a taxa de combustão do combustível são reduzidas e o desempenho do motor é prejudicado (KALAYASIRI; JEYASHOKE; KRISNANGKURA, 1996; LEUNG; KOO; GUO, 2006; TUBINO; ARICETTI, 2013).

## 1.2 PRODUÇÃO DE BODIESEL E IMPACTO ECONÔMICO

De acordo com dados estatísticos da ANP, apenas no ano de 2018, o volume de biodiesel produzido no Brasil foi de 5.350.036 m<sup>3</sup>. No período correspondente de janeiro até junho de 2019, o volume de biodiesel produzido foi de 2.237.144 m<sup>3</sup> (ANP, 2019). De acordo com o Jornal Estado de Minas (2019), O Conselho Nacional de Política Energética (CNPE)

estima que a produção anual de biodiesel atinja os 10 bilhões de litros até 2023. A expectativa é a quantidade de biodiesel adicionado no diesel chegue até 15% até 2023, estando agora em 10% (EM, 2019).

Devido a grande produção de biodiesel, o impacto produzido na economia é notável. Segundo a Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil (APROBIO), apenas no período de 2016 - 2018, a produção de biodiesel ampliou em cerca de R\$ 90 bilhões o Produto Interno Bruto (PIB) do país, além de contribuir na geração de mais de 200 mil novos empregos (APROBIO, 2019).

Os maiores consumidores de diesel e biodiesel são os veículos. Em 2018, a frota total de veículos rodoviários no Brasil era de quase 66 milhões, dos quais 2 milhões são referentes aos caminhões e 376 mil à frota de ônibus (IBPT, 2018). Se apenas as frotas de ônibus e caminhões forem consideradas, existem aproximadamente 2,4 milhões de motores abastecendo com uma mistura de diesel e biodiesel, considerando unicamente o transporte rodoviário no país. Assim, a utilização de um combustível de baixa qualidade pode danificar milhões de veículos e gerar bilhões em prejuízo. Para monitorar bilhões de litros de combustível, o desenvolvimento de métodos analíticos com grande velocidade, frequência analítica e reprodutibilidade torna-se uma importante linha de pesquisa.

### 1.3 AVANÇOS NO CONTROLE DE QUALIDADE DE BIODIESEL

Para comercialização, o regulamento técnico ANP N°3/2014 (em anexo na RANP - 45), determina que normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), da *International Organization for Standardization* (ISO), e do *Comité Européen de Normalisation* (CEN) devem ser utilizados para controle de qualidade do biodiesel (ANP, 2014). Em termos de avanços científicos, métodos alternativos também são apresentados na literatura. As seções seguintes descrevem alguns métodos oficiais (normas técnicas) e métodos alternativos propostos na literatura em relação às análises de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , GL e GT e índice de iodo.

#### 1.3.1 Métodos para determinação de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{+2}$ , $\text{Mg}^{+2}$ em biodiesel

No Brasil, através do regulamento técnico da ANP (n°3/2014), as determinações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ , e  $\text{Mg}^{+2}$  podem ser realizadas através da norma técnica NBR 15553:2015, que

utiliza espectrometria de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (ABNT, 2015a). A norma NBR 1556:2008 também determina o teor dos quatro cátions, contudo, utiliza espectrometria de absorção atômica (ABNT, 2008a). O teor de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  pode ser determinado separadamente pelas normas NBR 15554:2008 (ABNT, 2008b) e NBR 15555:2008 (ABNT, 2008c) que também utilizam espectrometria de absorção atômica.

Em 2014, Pereira *et al.* determinaram  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  por espectrometria de absorção atômica em chama. Os autores mostraram uma nova maneira de extrair os cátions inorgânicos do biodiesel, que consiste em realizar uma extração induzida por emulsão, onde o biodiesel é misturado com uma solução contendo  $\text{HNO}_3$  e 7,5% m/v de Triton X – 114. A emulsão pode ser eliminada em 10 minutos quando aquecida a 90 °C. Após 10 minutos, a fase aquosa é coletada, diluída com padrão interno ( $\text{Co}^{+2}$ ), e os sinais dos analitos são medidos no equipamento de absorção atômica.

Como demonstrado por Caland *et al.* em 2012, a cromatografia de troca iônica também pode ser utilizada para determinar cátions inorgânicos em amostras de biodiesel. O método requer uma coluna modelo *Metrosep C4* com 100 mm de comprimento e 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partículas e uma fase móvel composta de 1,7  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido dipicolínico e 2,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$ . A extração dos cátions foi realizada utilizando ultrassom com frequência de 50 kHz e aquecimento por 10 minutos para extrair  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$ , e 15 minutos para extrair  $\text{Mg}^{+2}$ .

A voltametria também aparece como opção para determinação de cátions em biodiesel. A determinação de  $\text{K}^+$  em biodiesel pode ser realizada com uma célula eletroquímica composta por um eletrodo de carbono vítreo modificado, um eletrodo de platina e um eletrodo saturado de calomelano, que são os eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência, respectivamente (DE SOUZA CASTILHO; STRADIOTTO, 2008). A determinação de  $\text{Ca}^{+2}$  pode ser realizada através de voltametria de onda quadrada e sem necessidade de modificações da superfície do eletrodo de trabalho. O método foi desenvolvido baseando-se na capacidade do  $\text{Ca}^{+2}$  em complexar com o EDTA. Ao realizar uma varredura entre  $\pm 1000$  mV, o pico de oxidação do  $\text{Ca}^{+2}$  complexado é observado em 200 mV e esse sinal é proporcional à concentração do analito (ALMEIDA *et al.*, 2014).

Eletroforese capilar (CE) também foi utilizada em 2010 para analisar  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  utilizando  $\text{Ba}^{+2}$  como padrão interno. No método proposto, foi utilizado um capilar de

32,5 cm com 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno. O eletrólito utilizado era composto por 10  $\text{mmol L}^{-1}$  de imidazol e 40  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido acético. A injeção da amostra foi realizada de maneira hidrodinâmica com 50 mbar por 5s. Os limites de quantificação e detecção calculados variaram entre 1,0 a 0,3  $\text{mg Kg}^{-1}$ . A extração proposta nesse método é realizada apenas com água deionizada e requer agitação durante 20 minutos (PIOVEZAN *et al.*, 2010).

### 1.3.2 Métodos para determinação de GL e GT em biodiesel

Para determinação de GL, GT, mono-, di- e triglicerídeos, o regulamento técnico nº3/2014 da ANP determina o uso da NBR 15908 (ABNT, 2015b), que utiliza a cromatografia gasosa. Para determinação de GT e teor de triglicerídeos, o regulamento técnico estipula a utilização da NBR 15344, onde a determinação de GT é realizada através de iodometria (ABNT, 2016). O parâmetro GL isoladamente também pode ser determinado por volumetria, através da NBR 15771:2009.

Métodos alternativos também são encontrados na literatura. Em 1995, foi publicado um método para determinação de GL, mono-, di- e triglicerídeos em ésteres metílicos provenientes da reação com óleos vegetais. A estratégia da técnica é derivatizar a glicerina, mono- e diglicerídeos com N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoracetamida (MSTFA). Assim, a análise é realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama e a separação ocorre em uma coluna DB-5 de 10 m com 0,32 mm de diâmetro interno e espessura de fase estacionária de 0,1  $\mu\text{m}$ . No método descrito, os monoglicerídeos são eluídos através da coluna em aproximadamente 16 minutos, os diglicerídeos em aproximadamente de 21 minutos e os triglicerídeos em cerca de 30 minutos (PLANK; LORBEER, 1995).

Ribeiro e Rocha, em 2013, desenvolveram um método espectrofotométrico para análise de GL em biodiesel. O método descrito não necessita de extração líquido-líquido (LLE) para extrair a glicerina da fase orgânica. Nesse caso, o biodiesel foi dissolvido com etanol, que também é solúvel com os reagentes necessários para que o método seja realizado. A glicerina reage com periodato formando formaldeído. O formaldeído então reage com acetilacetona para formar 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina, que tem um máximo de absorção de radiação no comprimento de onda de 410 nm, onde são monitoradas as análises.

Voltametria também pode ser aplicada para determinação de GL em biodiesel utilizando uma célula eletroquímica convencional de 25 mL em um arranjo com três eletrodos. O eletrodo de trabalho é um disco de platina com uma área de 0,125  $\text{cm}^2$ , o eletrodo

auxiliar é um eletrodo de platina e o eletrodo de referência é composto de  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{saturado}}$ . Os voltamogramas são obtidos em solução contendo  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido perclórico. Os ciclos voltamétricos são configurados entre  $-0,14 \text{ V}$  e  $+1,3 \text{ V}$  vs  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{saturado}}$  com uma taxa de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Embora a obtenção dos voltamogramas seja rápida, o preparo de amostra é demorado, envolvendo lavagens do biodiesel com água quente, centrifugações e destilação da fase orgânica por 3 horas para remover qualquer água residual da amostra (LOURENÇO; STRADIOTTO, 2009).

A cromatografia líquida também pode ser utilizada para determinação de GL utilizando um HPLC com detecção amperométrica pulsada, uma coluna AM1 (DIONEX) e uma fase móvel composta por solução aquosa de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH. Nas condições propostas, o pico referente à glicerina tem um tempo de retenção de 5,71 minutos. O método apresenta limite de quantificação de  $1 \text{ mg Kg}^{-1}$  (LOZANO *et al.*, 1996).

Como proposto por Gonçalves Filho e Micke em 2007, a eletroforese capilar (CE) também pode ser utilizada para determinação de GL. Para extrair a GL do biodiesel, é necessário realizar uma LLE com clorofórmio e água. A glicerina então reage com periodato e forma o iodato, como demonstra a seguinte reação:  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3 + 2\text{HIO}_4 \rightarrow 2\text{CH}_2\text{O} + \text{HCOOH} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{HIO}_3$ . O método proposto determina o teor de GL através do pico observado de iodato. A separação é rápida e ocorre em menos de 30 s, porém, o preparo da amostra demora aproximadamente 30 minutos. O eletrólito desenvolvido foi composto por  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de glicina e  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido trifluoracético. O capilar utilizado foi de sílica fundida com  $32 \text{ cm} \times 50 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro interno.

Em 2013, Spudeit *et al.* desenvolveram um método para determinação de GL e GT em amostras de biodiesel por eletroforese capilar. No método proposto, a glicerina ligada era convertida a GL através de uma reação do biodiesel com KOH em meio etanólico e, posteriormente, a reação era neutralizada com uma mistura de ácido acético e clorofórmio (25:75 v/v). A extração de GL era realizada com água deionizada. A glicerina formada então reage com periodato e a GT e GL são quantificadas através da formação de iodato. As amostras de GT e GL foram injetadas pela mesma extremidade do capilar de maneira sequencial. O eletrólito de corrida utilizado foi composto por  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido trifluoracético e  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de glicina e a separação dos picos de interesse ocorreu em menos de 30 s (SPUDEIT *et al.*, 2013).

### 1.3.3 Método para determinação de $K^+$ , $Na^+$ , $Ca^{+2}$ e $Mg^{+2}$ GL e GT por CE

Em 2012, Spudeit desenvolveu um método para determinação de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$  GL e GT por CE em amostras de biodiesel. Uma breve descrição do método está representada na tabela 1. Em resumo, preparam-se as amostras para análise de cátions, GL e GT separadamente. As amostras de cátions são injetadas pela extremidade oposta do capilar em relação às injeções das amostras de GL e GT. Entre as injeções de GL e GT é injetado eletrólito de corrida para não haver junção das duas amostras. Para realizar a análise de GL e GT, após etapas de LLE, é adicionado solução de periodato ( $IO_4^-$ ) para formação de iodato ( $IO_3^-$ ), que é o analito utilizado para quantificação de GL e GT. Com a aplicação de uma diferença de potencial entre os eletrodos, os cátions e ânions migram em direção ao eletrodo de carga oposta, e atravessam a mesma janela de detecção (SPUDEIT, 2012).

Tabela 1: Descrição sucinta do método proposto por Spudeit em 2012 para determinação de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$ , glicerina livre e total.

Analitos	Versão simplificada do preparo de amostras	Modo de injeção
$K^+$ , $Na^+$ , $Ca^{+2}$ e $Mg^{+2}$	200 mg de biodiesel + solução de $Ba^{+2}$ → agitação da solução por 5 min. → centrifugação por 10 min.	Hidrodinâmica pela extremidade positiva do capilar (40 mbar, 5s)
<b>Glicerina Livre (GL)</b>	200 mg de biodiesel + 800 $\mu$ L de água deionizada + 200 $\mu$ L de clorofórmio → homogeneização → centrifugação por 5 min → diluição com solução de periodato antes de injetar.	hidrodinâmica pela extremidade negativa do capilar. Injeção GL: -40mbar 2s
<b>Glicerina Total (GT)</b>	100 mg de biodiesel + 1 mL de KOH 1,25 % (m/m) e tempo de reação de 10 min → acidificação da solução com solução de ácido acético e clorofórmio → diluição da amostra com 5 mL de solução de $NO_3^-$ (200 mg $L^{-1}$ ) → centrifugação por 5 min. → diluição com solução de periodato antes de injetar.	Injeção de espaçador de eletrólito entre GT e GL: -40mbar por 6s Injeção de GT: -40mbar por 3s

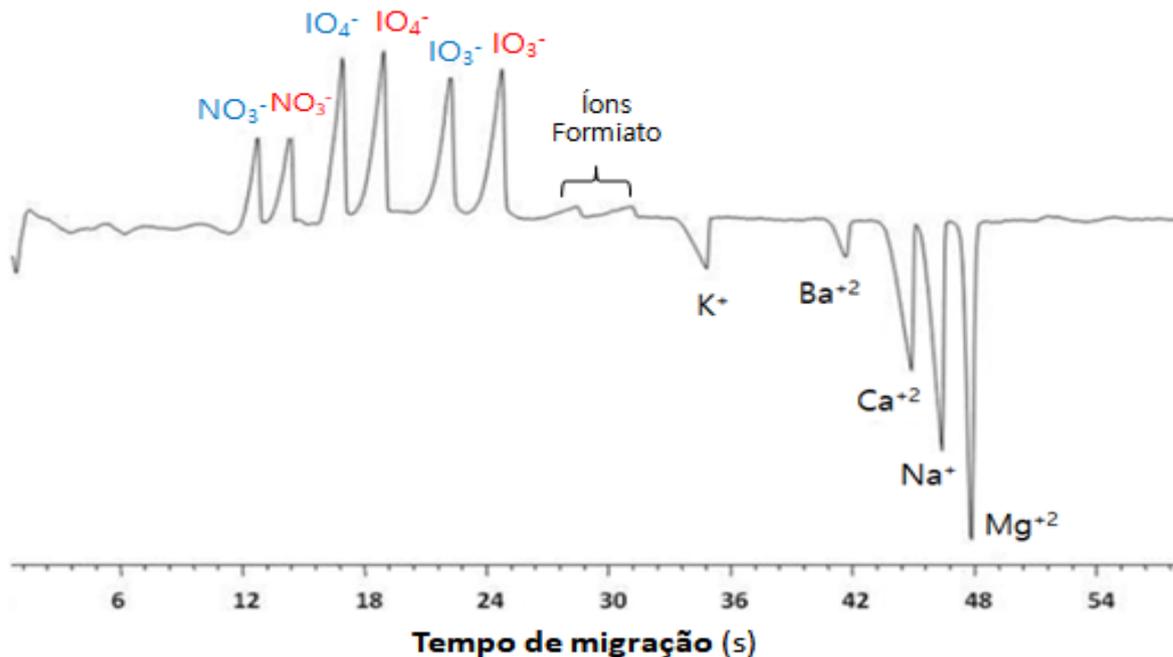
**Condições Experimentais:**  
 Modelo do equipamento: Agilent HP3D-CE  
 Eletrólito: Imidazol (15 mmol  $L^{-1}$ ) e ácido acético (120 mmol  $L^{-1}$ )  
 Pré-condicionamento entre as corridas: 30 segundos com eletrólito de corrida  
 Capilar de sílica: 32,5 cm x 75  $\mu$ m de diâmetro interno  
 Temperatura: 25 °C  
 Comprimento de onda observado: 210 nm  
 Ordem de injeção das amostras indiferente

Fonte: Adaptado de Spudeit (2012).

O método proposto por Spudeit em 2012 é direto para análise de GL e GT, pois o íon  $\text{IO}_3^-$  absorve no UV. Para correção das áreas dos picos referentes aos ânions, foi adicionado  $\text{NO}_3^-$  como padrão interno. Em relação à análise de cátions o método é indireto, pois os cátions apresentam baixa absorvidade molar. As áreas dos cátions foram corrigidas utilizando o  $\text{Ba}^{+2}$  como padrão interno. O co-íon para os cátions é o grupo imidazol protonado.

No método proposto por Spudeit em 2012, a separação de todos os picos de interesse no sistema de eletroforese ocorre em menos 1 minuto (figura 2). O método também apresenta pontos que podem ser aprimorados. A extração dos cátions apenas com água deionizada não extrai todos os cátions com grande eficiência. Picos de íons formiato também aparecem no eletroferograma (figura 2) e podem comigrar com o pico do  $\text{K}^+$  caso a velocidade do fluxo eletrosmótico aumente durante as análises, reduzindo a reprodutibilidade do método. Apesar de a separação ser rápida, as etapas de homogeneização e centrifugação das amostras requerem muito tempo.

Figura 2: Eletroferograma obtido pelo método proposto por Spudeit em 2012. Analitos em azul são referentes a análise de GL e, em vermelho, são referentes a análise de GT.



Fonte: Adaptado de Spudeit 2012.



construir um modelo multivariado e foram encontradas correlações entre os seis parâmetros de qualidade do biodiesel com os espectros obtidos. O tempo para obtenção do espectro é de apenas 2 min. (SHIMAMOTO; TUBINO, 2018).

O índice de iodo também pode ser determinado através de um *spot test*. Nesse método, uma solução etanólica de  $I_2$  é misturada ao biodiesel. Um pequeno volume da solução é coletado e misturado com uma solução de amido. O complexo entre amido e iodo é formado e a imagem é capturada através de um *smartphone*. A imagem é convertida para valores de RGB usando um *software* apropriado. Os valores convertidos pelo *software* são utilizados na quantificação do índice de iodo das amostras (SOARES; LIMA; ROCHA, 2017).

Um método para determinação de índice de iodo em amostras de biodiesel através de espectrofotometria também foi desenvolvido. Nesse método é utilizada uma solução reagente composta por KI e  $I_2$ , formando a espécie  $I_3^-$ . Quando  $I_3^-$  reage com as insaturações do biodiesel, a concentração de  $I_3^-$  também é reduzida e existe diminuição da absorção de radiação que pode ser observada em 450 nm. O método é automatizado, onde é utilizado um sistema de análise em fluxo por multicomutação para inserir o reagente entre dois volumes de amostra em uma célula reacional (PEREIRA; ROCHA, 2014).

#### 1.4 A PROPOSTA DO TRABALHO

Entre as técnicas de separação disponíveis para determinação de parâmetros de qualidade de biodiesel destaca-se a CE. Métodos desenvolvidos por CE normalmente apresentam baixo tempo de análise, baixo consumo de reagentes e amostra, alta eficiência de separação e baixo custo operacional (FEKETE; SCHMITT-KOPPLIN, 2007). Como demonstrado por Spudeit em 2012, a CE também apresenta a opção de injeção das amostras por ambas as extremidades do capilar. Essa característica particular da CE é um diferencial inovador frente às técnicas de GC e HPLC.

Visando aprimorar o controle de qualidade de amostras de biodiesel, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um método para determinação de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ , GT e GL e um método para determinação de índice de iodo, ambos para análise de biodiesel através de eletroforese capilar.

A determinação de cátions, GT e GL pode ser realizada de maneira análoga ao método proposto por Spudeit em 2012, porém com as correções necessárias para melhorar a extração dos cátions, a reprodutibilidade do método e a velocidade de preparo das amostras. Em relação à análise de cátions, também é possível realizar a quantificação das amostras através de um método sem calibração. Nesse caso, são utilizadas equações específicas para métodos indiretos por CE que estão descritas nas seções 1.5.5 e 1.5.5.1.

Em relação à determinação do índice de iodo em amostras de biodiesel, esse foi o primeiro trabalho descrito na literatura onde essa determinação é realizada através CE. Para o desenvolvimento desse método, dois modos de calibração foram testados: curva de calibração externa (CCE) e calibração de ponto único (CPU).

Para desenvolvimento dos métodos propostos e compreensão dos estudos demonstrados, é importante compreender algumas características fundamentais da técnica de eletroforese capilar. A seção 1.5 descreve aspectos importantes da técnica, onde também estão inseridos fórmulas e conceitos que foram utilizados no decorrer do trabalho.

## 1.5 ELETROFORESE CAPILAR

### 1.5.1 Introdução da técnica

A eletroforese foi primeiramente utilizada por Tiselius no início da década 30 e a primeira aplicação da técnica foi a separação parcial de proteínas do soro sanguíneo. Pela importância de seu feito, em 1948, Tiselius recebeu o prêmio Nobel. Entretanto, foi apenas em 1979 que o primeiro experimento utilizando eletroforese e tubos de pequeno diâmetro (200  $\mu\text{m}$ ) foi realizado. Nesse experimento, Evarearts *et al.* conseguiram separar 16 ânions aplicando uma diferença de potencial entre as extremidades de um tubo de teflon. A partir de 1980 vários esforços foram realizados para transformar a CE em uma técnica analítica e várias modalidades de CE foram desenvolvidas (TAVARES, 1995).

### 1.5.2 Modalidades da eletroforese capilar

A modalidade mais simples da técnica é a eletroforese capilar de zona (CZE), onde os analitos migram em zonas discretas e em velocidades diferentes. Porém, para separar analitos neutros, é necessário utilizar estratégias diferentes. A cromatografia eletrocínética

micelar (MEKC) é uma forma de separação onde os analitos neutros interagem com um aditivo micelar adicionado ao eletrólito de corrida e podem, portanto, ser separados. (ÁLVAREZ-RIVERA; CIFUENTES; CASTRO PUYANA, 2018; SHALLAN; GUIJT; BREADMORE, 2013; TAVARES, 1997).

A cromatografia eletrocinética quiral é a modalidade onde aditivos (neutros ou carregados), com capacidade de seleção quiral, são adicionados ao eletrólito. Quando os analitos são macromoléculas, como proteínas e moléculas de DNA, pode-se utilizar a eletroforese capilar em gel (CGE), onde a separação dos analitos ocorre por uma espécie de “peneiramento” devido ao meio de separação ser uma matriz polimérica (ÁLVAREZ-RIVERA; CIFUENTES; CASTRO PUYANA, 2018; SHALLAN; GUIJT; BREADMORE, 2013; TAVARES, 1997).

A focalização isoelétrica (IEF) é a estratégia de separação utilizada para separar analitos anfóteros de acordo com seu ponto isolétrico. Na IEF o capilar é preenchido com um eletrólito que contém vários anfólitos, de maneira que exista um gradiente de pH ao aplicar o campo elétrico. O analito então migra pelas diferentes zonas até atingir a zona onde o pH é igual ao seu ponto isoelétrico. Nessa zona, os analitos não tem mais mobilidade e são focalizados. Porém, através de difusão, os analitos atingem zonas adjacentes onde adquirem carga novamente e retornam para sua zona de neutralidade. Esse processo gera bandas estreitas e picos finos são obtidos. O analito então deve chegar ao detector e tal processo pode ser realizado através de pressão ou voltagem (ÁLVAREZ-RIVERA; CIFUENTES; CASTRO PUYANA, 2018; SHALLAN; GUIJT; BREADMORE, 2013; TAVARES, 1997).

A isotacoforese (ITP) é a modalidade de separação onde mais de um eletrólito é injetado dentro do capilar. Nesse caso, existem dois tipos de eletrólitos: o eletrólito líder e o terminador. A amostra é injetada entre esses dois eletrólitos. O co-íon do eletrólito líder deve ser mais rápido que o analito e, para o eletrólito terminador, mais lento (ÁLVAREZ-RIVERA; CIFUENTES; CASTRO PUYANA, 2018; SHALLAN; GUIJT; BREADMORE, 2013; TAVARES, 1997). Várias zonas discretas e adjacentes entre si são formadas. A criação das zonas depende da mobilidade de cada analito. Embora o potencial através das zonas seja igual, nas interfaces entre as zonas, o potencial aumenta para manter a mesma corrente elétrica. Em um determinado momento, é alcançado um estado estacionário onde a amostra é pré-concentrada e migra com velocidades iguais as zonas de eletrólito, de maneira que não há

espaços entre as interfaces das zonas. O sinal gerado é um eletroferograma com vários degraus, onde a altura e comprimento de cada degrau são proporcionais à mobilidade e concentração de um determinado analito (POOLE, 2003).

A eletrocromatografia capilar (CEC) é uma modalidade da CE onde o capilar é preenchido com uma fase estacionária. Quando uma diferença de potencial entre os eletrodos é aplicada, os analitos migram em direção ao detector e, durante a migração, interagem de diferentes formas com fase a estacionária. Compostos neutros ou ionizados podem ser separados nessa modalidade que reúne características de técnicas de HPLC com CE (ÁLVAREZ-RIVERA; CIFUENTES; CASTRO PUYANA, 2018; POOLE, 2003; SHALLAN; GUIJT; BREADMORE, 2013).

### 1.5.3 Instrumentação da CE

Os equipamentos de eletroforese capilar possuem diversos componentes em sua estrutura. O sistema de eletroforese é composto essencialmente por (SHALLAN; GUIJT; BREADMORE, 2013; TAVARES, 1995):

- Uma fonte de alta tensão.
- Dois eletrodos de material inerte (platina, por exemplo) para aplicação da diferença de potencial (0–50 kV).
- Um tubo capilar, sendo o mais comum feito de sílica fundida.
- Um sistema de detecção. Exemplos: condutividade, espectrometria de massas, espectrometria de UV–VIS, fluorescência entre outros.
- Sistema de inserção de amostra e/ou eletrólito dentro do tubo capilar. Exemplos: sifonagem, injeção hidrodinâmica ou eletrocínética.

Para desenvolvimento dos métodos propostos nesse trabalho, foi utilizado um equipamento com sistema de injeção hidrodinâmica e detecção de UV. A injeção de amostras e eletrólito pode ser realizada através da aplicação de uma diferença de pressão entre as extremidades do capilar. O volume de injeção ( $V_{inj}$ ), é ditado pela equação de Hagen-Poiseuille (equação 1), onde  $\Delta P$  é a diferença de pressão (Pa) aplicada,  $d_{int}$  é o diâmetro interno do capilar (m),  $t_{\Delta p}$  é o tempo (s) de aplicação da diferença de pressão,  $\eta$  é a

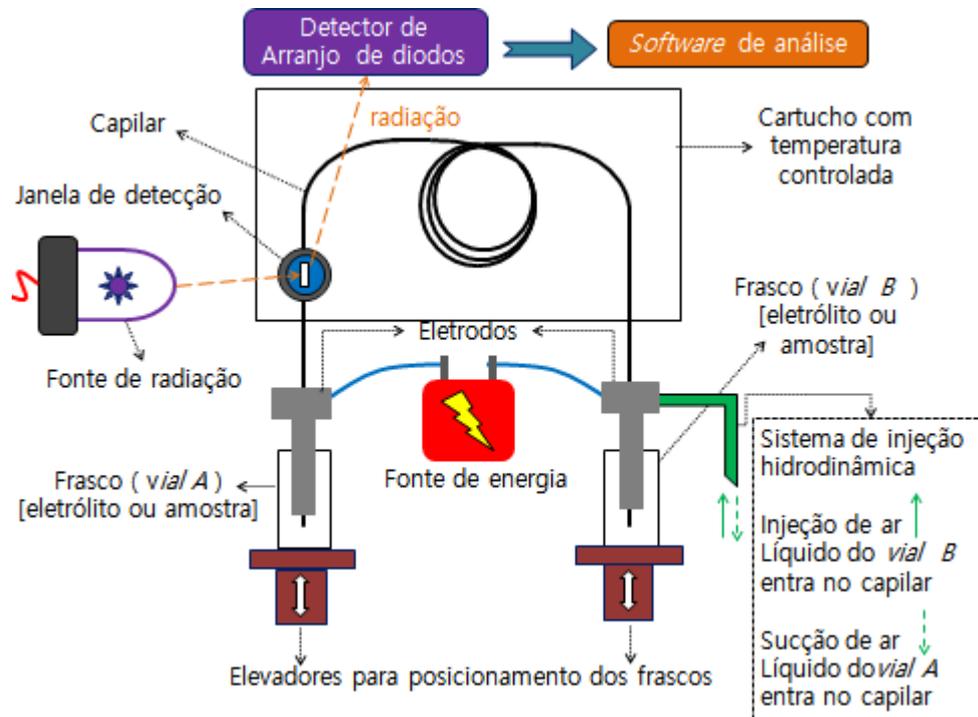
viscosidade (Pa s) e  $L_{Tot}$  é o comprimento total (m) do capilar (PAPETTI; COLOMBO, 2019; PERRETT, 2002; WESTON; BROWN, 1997).

$$V_{inj} = \frac{\Delta P \pi d_{int}^4 t_{\Delta p}}{128 \eta L_{tot}} \quad (1)$$

Em termos de detecção, o equipamento realiza as análises usando os princípios da espectrometria de absorção molecular no UV–VIS. Dois modos de detecção são possíveis: o modo direto e modo indireto. No modo direto, o analito absorve radiação ao atingir a janela de detecção e um pico de absorção é detectado. No modo indireto, o eletrólito que preenche o capilar absorve radiação. Quando um analito não absorvente atravessa a janela de detecção, a absorção do eletrólito de corrida diminui, e o pico obtido no eletroferograma é negativo (CREGO; LUISA MARINA, 2005; WESTON; BROWN, 1997). Alguns detalhes mais específicos sobre métodos indiretos estão discutidos na seção 1.5.5. A lâmpada emissora de radiação normalmente é de arco de deutério, emitindo radiação entre a faixa de 180 a 600 nm (CREGO; LUISA MARINA, 2005).

A figura 4 é uma representação gráfica de um equipamento de eletroforese capilar com detecção por UV-VIS e sistema de injeção hidrodinâmica. O capilar é encaixado dentro de um cartucho onde a temperatura pode ser controlada através de um sistema de refrigeração a ar ou a água. Os frascos são posicionados de maneira que os eletrodos fiquem parcialmente submersos durante a aplicação de potencial ou durante a injeção das amostras. Com a aplicação da diferença de potencial, os analitos migram através do capilar e atravessam a janela de detecção. O *software* de análise então transforma a informação obtida pelo detector em eletroferogramas (PAPETTI; COLOMBO, 2019).

Figura 4: Representação de um equipamento de CE com sistema de injeção hidrodinâmica e detecção por espectrometria de UV- VIS.



Fonte: O autor.

## 1.5.4 Aspectos teóricos de separação por Eletroforese Capilar de Zona

### 1.5.4.1 Mobilidades efetivas e aparentes

A eletroforese capilar é uma técnica de separação onde compostos migram em diferentes velocidades quando existe um campo elétrico presente no canal de separação. O campo elétrico é formado através da aplicação de uma diferença de potencial entre as extremidades de um capilar (PAPETTI; COLOMBO, 2019; TAVARES, 1995).

Um determinado íon, na presença de um campo elétrico, move-se em uma direção específica com uma velocidade que depende de sua mobilidade. Caso a força iônica do meio seja baixa, a mobilidade iônica do íon ( $\mu_{iônica}$ ) pode ser calculada através da equação 2, onde  $z_A$  é magnitude da carga do íon,  $e$  é a carga elementar,  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $r_{iôn}$  é o raio iônico efetivo do íon (TAVARES, 1995).

$$\mu_{iônica} = \frac{|z_A|e}{6\pi\eta r_{iôn}} \quad (2)$$

Como podem existir diferentes formas iônicas de um analito, leva-se em consideração as frações molares ( $\alpha$ ) de cada forma ionizada ( $f$ ) do analito. A mobilidade efetiva ( $\mu_{\text{eff}}$ ) de um determinado analito A pode ser então calculada através da equação 3 (TAVARES, 1995). Na equação 3, cada uma das formas carregadas do analito tem uma mobilidade iônica  $\mu_f$  diferente. O resultado de  $\mu_{\text{eff A}}$  é um somatório dos produtos entre as mobilidades iônicas e frações molares de cada forma  $f$ . A separação dos analitos ocorre quando existe diferença entre suas mobilidades efetivas (TAVARES, 1995).

$$\mu_{\text{eff A}} = \sum \mu_f \alpha_f \quad (3)$$

A velocidade do analito ionizado é dada pela equação 4, onde  $E$  é o campo elétrico ( $\text{V m}^{-1}$ ). O campo elétrico é dado pela razão entre a diferença de potencial aplicada entre as extremidades do capilar e o comprimento total do capilar ( $L_{\text{tot}}$ ) (WUETHRICH; QUIRINO, 2017).

$$v_A = \mu_{\text{eff A}} E \quad (4)$$

Na literatura, também é encontrado o termo mobilidade aparente ( $\mu_{\text{ap}}$ ). A mobilidade aparente é a mobilidade calculada através da equação 5 ou 6. Na equação 5,  $L_{\text{det}}$  é referente ao comprimento do capilar que o analito percorre até atingir o detector (ou janela de detecção). No denominador,  $t_m$  é o tempo de migração do analito, e  $V$  é a diferença de potencial aplicada entre as duas extremidades do capilar (SHALLAN; GUIJT; BREADMORE, 2013). A equação 6 contém o termo  $\mu_{\text{EOF}}$  que representa a mobilidade do fluxo eletrosmótico. A descrição do fluxo eletrosmótico encontra-se na seção 1.5.4.2.

$$\mu_{\text{ap}} = \frac{L_{\text{det}} L_{\text{Tot}}}{t_m V} \quad (5)$$

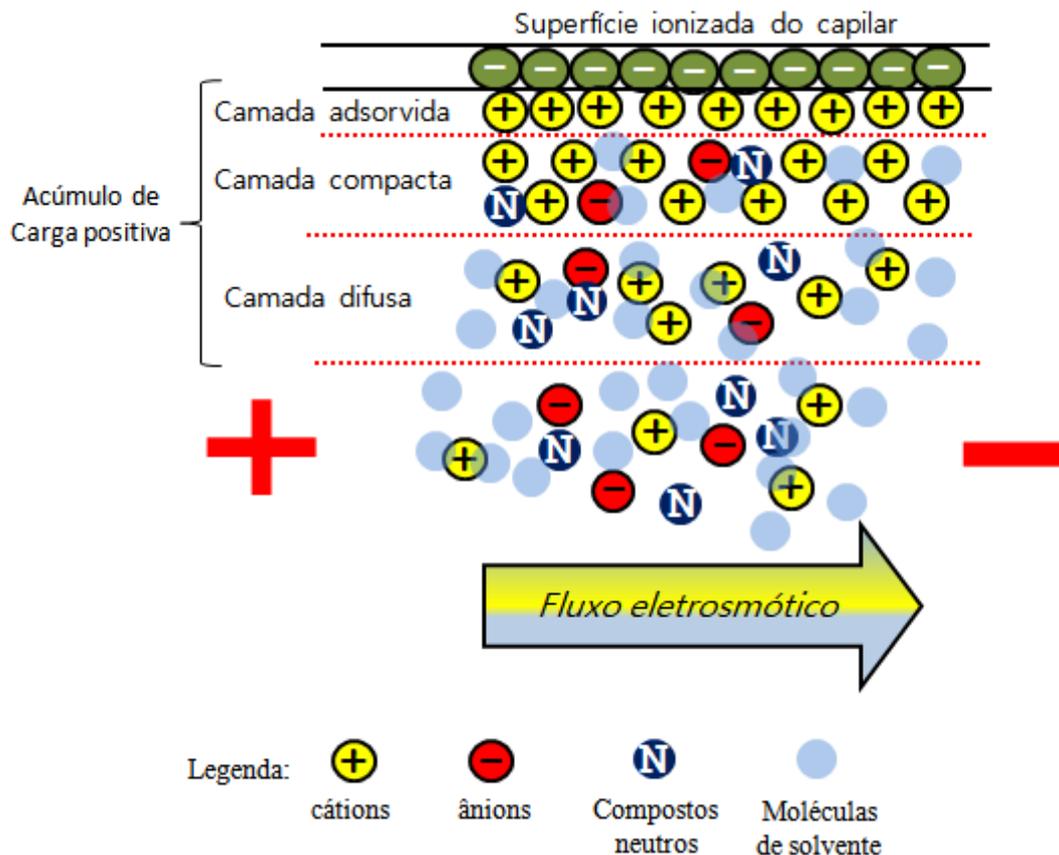
$$\mu_{\text{ap}} = \mu_{\text{eff A}} + \mu_{\text{EOF}} \quad (6)$$

#### 1.5.4.2 Fluxo eletrosmótico

Em contato com um eletrólito cujo pH é maior que 2, a superfície interna de um capilar de sílica possui carga negativa devido a existência de grupos silanóis levemente ácidos (POOLE, 2003; SHALLAN; GUIJT; BREADMORE, 2013). Para contrabalancear a carga negativa, cátions do eletrólito de corrida são encontrados em leve excesso na região próxima a superfície carregada. Alguns cátions ficam fortemente adsorvidos sobre a superfície (POOLE, 2003). Adjacente à superfície, também há uma camada compacta de cátions não adsorvidos, mas que não se movem durante a aplicação de potencial. Fortes interações do tipo dipolo ocorrem entre as moléculas de água quando o campo elétrico é aplicado e a viscosidade da camada compacta aumenta muito a ponto de ser considerada imóvel (POOLE, 2003). Porém, adjacente à camada compacta, existe uma camada difusa, onde os cátions ainda estão em razoável excesso e podem se mover livremente quando a diferença de potencial é aplicada. A migração dos cátions e suas camadas de hidratação associadas geram um fluxo de toda solução em direção ao eletrodo de carga negativa. Esse fenômeno é denominado fluxo eletrosmótico (EOF) (POOLE, 2003).

A figura 5 é uma representação do EOF e também demonstra a organização das camadas próximas à superfície do capilar. O EOF é um fenômeno que permite realizar análises de cátions e ânions em apenas uma corrida, além de participar efetivamente de separações em MEKC e CEC (SCHUETZNER; KENNDLER, 1992). Porém, o EOF é suscetível a variações que podem prejudicar a reprodutibilidade dos métodos. Fatores como volume de amostra injetada e a composição de sua matriz, eletrólise dos componentes do eletrólito, integridade da superfície do capilar, condições de ausência de equilíbrio entre eletrólito e superfície do capilar e variações de temperatura diminuem a reprodutibilidade do EOF (SCHAEPER; SEPANIAK, 2000). A distribuição desigual das cargas da superfície também pode gerar fluxos não axiais com efeitos imprevisíveis sobre a separação (SLATER; TESSIER; KOPECKA, 2010).

Figura 5: Representação do fluxo eletrosmótico.



Fonte: O autor.

#### 1.5.4.3 Fatores que afetam a simetria de pico em CE

Em CE, o alargamento dos picos está associado a fatores como difusão longitudinal, difusão turbulenta, adsorção do analito na superfície do capilar, heterogeneidade do EOF, heterogeneidade do campo elétrico, efeito joule e dispersão por eletromigração (EMD) (FANG; TING; CHEN, 2004). Apesar de todos esses fatores contribuírem para o alargamento dos picos, difusão e EMD são os mais importantes, pois são originados a partir do próprio processo de eletromigração (DVOŘÁK *et al.*, 2019).

Quando um eletrólito homogêneo é utilizado, o formato do pico depende apenas dos processos de difusão que cada analito sofre (GEBAUER; BOČEK, 1997). A dispersão por eletromigração ocorre porque o analito modifica a condutividade e o pH do eletrólito de corrida, promovendo assim mudanças em sua velocidade de migração. Porém, o nível de

alteração de velocidade do analito depende da sua posição na zona de amostra (GEBAUER; BOČEK, 1997).

A obtenção de picos estreitos em CE normalmente é descrita na literatura como dependente das mobilidades efetivas dos analitos e do co-íon (CO) do analito que está presente no eletrólito. Quando  $\mu_{\text{eff A}} = \mu_{\text{eff CO}}$  o pico do analito é estreito e simétrico. Quando  $\mu_{\text{eff A}} > \mu_{\text{eff CO}}$ , existe alargamento frontal do pico. Caso  $\mu_{\text{eff A}} < \mu_{\text{eff CO}}$  o alargamento do pico é caudal (DVOŘÁK *et al.*, 2019; SHALLAN; GUIJT; BREADMORE, 2013). Porém, como descrito por Gebauer e Boček em 1997, o formato do pico não é apenas dependente de  $\mu_{\text{eff A}}$  e  $\mu_{\text{eff CO}}$ , pois é possível obter picos com formatos diferentes através da variação do pH do eletrólito. Ou seja, picos com alargamentos frontais podem ser convertidos a picos com alargamento caudais pela alteração do pH do eletrólito de corrida. Esse fato pode ocorrer mesmo em situações nas quais o analito encontra-se totalmente em sua forma ionizada (DVOŘÁK *et al.*, 2019; GEBAUER; BOČEK, 1997). Portanto, a “regra” de semelhança de mobilidades para obtenção de picos estreitos é mais aplicável a eletrólitos fracos (DVOŘÁK *et al.*, 2019).

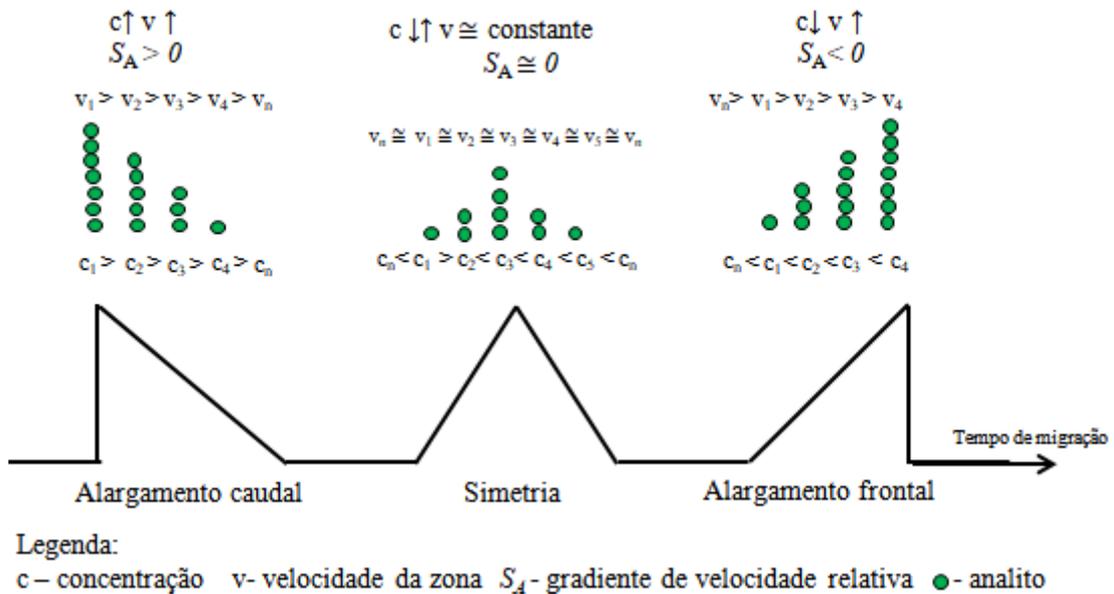
Para avaliar a capacidade do analito em sofrer os efeitos de dispersão por eletromigração, pode-se utilizar como referência o gradiente de velocidade relativa do analito ( $S_A$ ). O parâmetro  $S_A$  (equação 7) mostra como a velocidade de migração local do analito é alterada de acordo sua concentração local. Na equação 7,  $K$  é a condutividade na zona do analito,  $v_A$  é a velocidade do analito e  $c_A$  é a concentração do analito na zona de amostra (DVOŘÁK *et al.*, 2019).

$$S_A = \text{Lim}_{c_A \rightarrow 0} \frac{K}{v_A} \left( \frac{dv_A}{dc_A} \right) \quad (7)$$

O parâmetro  $S_A$  é avaliado através do conhecimento da composição do eletrólito de corrida, dos valores de pKa dos analitos e das mobilidades dos analitos. Quando  $S_A = 0$ , o pico obtido do analito é simétrico. Caso  $S_A > 0$  o pico do analito tem alargamento caudal. Se  $S_A < 0$  o alargamento do pico analito é frontal (DVOŘÁK *et al.*, 2019; GEBAUER; BOČEK, 1997; ŠTĚDRÝ; JAROŠ; GAŠ, 2002). Portanto, o parâmetro  $S_A$  tornou-se uma referência para avaliação da capacidade do analito de sofrer efeitos de EMD. Quanto mais próximo de zero é o valor de  $S_A$ , mais estreito e simétrico é o pico referente ao analito e, portanto, mesmo uma concentração relativamente alta do analito não produz a triangulação do pico. Porém, quando  $S_A$  é muito diferente de zero, mesmo uma pequena concentração do analito apresenta picos

muito triangulares (DVOŘÁK *et al.*, 2019; JAROŠ *et al.*, 2004). A figura 6 representa os tipos de alargamento de picos que ocorrem por efeitos de EMD em eletroforese capilar. Os valores de  $S_A$  indicam se a velocidade da zona do analito é alterada em função da sua concentração molar na zona.

Figura 6: Perfil dos picos com diferentes gradientes de velocidade relativa.



Fonte: O autor.

### 1.5.5 Métodos indiretos por CE

Os métodos indiretos desenvolvidos por CZE são baseados na capacidade de um componente do eletrólito de corrida que absorve radiação em deslocar um analito de interesse que não absorve radiação. Quando esse descolamento ocorre na janela de detecção, um sinal negativo é registrado pelo equipamento (CREGO; LUISA MARINA, 2005). A propriedade que define quantos moles dos íons absorvedores que são deslocados por um mol de íons não absorvedores é definida como razão de Transferência ( $TR$ ) e pode ser calculada através da equação 8. Essa equação pode ser utilizada em eletrólitos cujo pH está entre 4 - 10, pois as concentrações de íons  $H^+$  e  $OH^-$  são baixas e produzem efeitos desconsideráveis (BECKERS; BOČEK, 2004; NIELEN, 1991).

$$TR_{A:CO} = -\frac{z_A}{z_{CO}} \cdot \frac{\mu_{eff CO}}{\mu_{eff A}} \cdot \left( \frac{\mu_{eff A} + \mu_{eff CT}}{\mu_{eff CO} + \mu_{eff CT}} \right) \quad (8)$$

Na equação 8, Os subscritos  $A$ ,  $CO$  e  $CT$  são referentes ao analito, ao co-íon do analito e ao contra-íon do analito, respectivamente. Tanto  $CO$  como  $CT$  são integrantes do eletrólito de corrida. A equação é dependente das mobilidades efetivas ( $\mu_{eff}$ ) e das cargas ( $z$ ) dos íons (CREGO; LUISA MARINA, 2005; POOLE, 2003).

A queda de absorção pode ser relacionada à lei de Beer através da equação 9, onde  $\Delta Abs$  é a variação de absorção,  $\epsilon_A$  é a absorvidade molar do analito,  $\epsilon_{CO}$  é a absorvidade molar do co-íon do analito,  $d$  é o caminho ótico, e  $c_A$  é concentração do analito. Os subíndices têm o mesmo significado que os apresentados na equação 8 (CREGO; LUISA MARINA, 2005).

$$\Delta Abs = (\epsilon_A - TR_{A:CO} \cdot \epsilon_{CO}) d \cdot c_A \quad (9)$$

#### 1.5.5.1 Método indireto para cálculo de concentrações sem calibração

Em métodos indiretos por CZE, existe a possibilidade de realizar quantificações dos analitos através de um método sem calibração, pois a intensidade do pico obtido não é dependente da absorvidade molar do analito (BECKERS; BOČEK, 2004).

Em 2004, Beckers e Boček desenvolveram um modelo de quantificação sem calibração para métodos onde a detecção é indireta. O método é sem calibração porque não é necessário elaborar curvas de calibração para quantificação dos analitos. A quantificação é realizada através das equações 8, 10 e 11. Na equação 10,  $CF_A$  é o fator de conversão do analito,  $Ar_A$  é a área do pico do analito,  $t_A$  é o tempo de migração do analito e  $TR_{A:CO}$  é a razão de transferência calculada através da equação 8. Na equação 11,  $c_A$  é a concentração do analito, e  $c_p$  é a concentração de um padrão interno selecionado para análise. O termo  $CF_p$  é o fator de conversão do padrão interno, calculado através da equação 10 utilizando a área, o tempo de migração, e a razão de transferência do padrão interno (BECKERS; BOČEK, 2004).

$$CF_A = \frac{Ar_A}{t_A TR_{A:CO}} \quad (10)$$

$$c_A = \frac{CF_A}{CF_P} \cdot c_P \quad (11)$$

As equações 10 e 11 podem ser reajustadas para calcular a concentração  $c_A$  através da equação 12, onde  $t_p$  é o tempo de migração do padrão interno,  $TR_{P:CO}$  é a razão de transferência para o padrão interno e  $Ar_p$  é a área do pico do padrão interno. O  $TR_{P:CO}$  é calculado através da equação 8, porém utilizando a carga do padrão interno e sua mobilidade efetiva.

$$c_A = \frac{Ar_A t_p \cdot TR_{P:CO}}{t_A \cdot TR_{A:CO} \cdot Ar_P} \cdot c_P \quad (12)$$



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral da primeira parte do trabalho foi desenvolver um método para determinação de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , glicerina livre e glicerina total em amostras de biodiesel por CZE-UV.

O objetivo geral da segunda parte do trabalho foi desenvolver um método para determinação do índice em amostras de biodiesel por CZE-UV.

#### 2.1.1 Objetivos Específicos para determinação de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{+2}$ , $\text{Mg}^{+2}$ , GT e GL em amostras de biodiesel por CZE-UV

- Otimizar o eletrólito de corrida para obter melhores condições de separação dos analitos com base em simulações do programa *Peakmaster 5.3*.
- Otimizar parâmetros instrumentais como voltagem, tamanho do capilar, temperatura, etapas de injeção (ordem, tempo e pressão).
- Otimizar as etapas de extração dos cátions, GT e GL.
- Realizar a quantificação dos cátions através de um método sem calibração.
- Desenvolver uma estratégia para correção dos tempos de migração dos analitos.
- Validar o método desenvolvido em termos de especificidade, linearidade, faixa linear, precisão instrumental, precisão *intraday*, precisão *interday*, limite de quantificação e detecção, reprodutibilidade, precisão interlaboratorial, desempenho interlaboratorial e exatidão.
- Aplicação do método para análise de amostras de biodiesel.

### 2.1.2 Objetivos Específicos para determinação do índice em amostras de biodiesel por CZE-UV

- Otimizar o eletrólito de corrida para obtenção das melhores condições de separação dos analitos com base em simulações do programa *Peakmaster 5.3*.
- Otimizar os parâmetros operacionais do equipamento como, por exemplo, comprimento do capilar, temperatura do cartucho, tempo de injeção da amostra e potencial de separação.
- Otimizar o preparo de amostra para reduzir o tempo de reação de Wijs e reduzir o consumo de solventes.
- Desenvolver o método utilizando a curva de calibração externa (CCE) e a calibração de ponto único (CPU).
- Identificar os melhores níveis de concentração de  $\Gamma$  para realizar a calibração de ponto único.
- Validar o método analítico desenvolvido nos parâmetros de especificidade, linearidade, faixa linear, precisão instrumental, precisão *intraday*, precisão *interday*, exatidão, limites de quantificação e detecção.

### 3 PARTE I- DETERMINAÇÃO DE Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, GL E GT EM AMOSTRAS DE BIODIESEL POR CZE-UV

#### 3.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

##### 3.1.1 Instrumentação

O equipamento de eletroforese capilar utilizado nas análises foi o modelo 7100 da *Agilent Technologies* equipado com um detector de arranjo de diodos e sistema de refrigeração a ar. Capilares de sílica (*Polymicro Technologies*) revestidos externamente por poliimida de 75 µm de diâmetro interno foram utilizados nas análises. Agitadores Vortex do modelo QL-901 foram utilizados para homogeneização das amostras e soluções. Para centrifugar as amostras, foi utilizado um equipamento da marca *Eppendorf* modelo *MiniSpin Plus*.

##### 3.1.2 Padrões, soluções e amostras

Foram adquiridos soluções de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup> em 2% de HNO<sub>3</sub> da empresa *Sigma-Aldrich* (São Paulo, Brasil). Ácido trifluoracético puro foi adquirido da empresa *Sigma-Aldrich* (São Paulo, Brasil). Ácido acético glacial, HNO<sub>3</sub>, HCl, e KOH foram obtidos da empresa *Synth* (São Paulo, Brasil). Padrões de glicerina, imidazol, β-alanina, metaperiodato de sódio, ácido salicílico, 18-coroa-6 e etanolamina foram adquiridos da empresa *Sigma-Aldrich* (São Paulo, Brasil). Clorofórmio e etanol (EtOH) foram adquiridos da empresa *Tedia* (São Paulo, Brasil). Todos os padrões e soluções adquiridos apresentavam pureza ≥ 99 %. Para preparo das soluções e amostras, água ultrapura foi obtida através de um sistema Milli-Q (*Millipore, Belford, MA, EUA*). Amostras certificadas de biodiesel para cátions em concentrações de 5, 10 e 20 mg kg<sup>-1</sup> foram adquiridas da empresa *LGC Standards*. Uma amostra analisada por diversos laboratórios (n ≥ 9) que utilizaram normas oficiais para determinação de cátions, GT e GL foi adquirida da empresa Rede Metrológica e foi nomeada como amostra interlaboratorial nesse trabalho. As normas utilizadas pelos diferentes laboratórios foram: DIN EN14538, NBR 15553, NBR 15556, NBR 15908, ASTM D 6584 e

NBR 15908. Uma amostra com laudo para GT e GL também foi concedida pela empresa JBS e foi nomeada como amostra ABL. Para ABL, o método de referência para elaboração do laudo foi o ASTM D 6584. Outras duas usinas forneceram amostras que, para o presente trabalho, foram nomeadas como B1 e B2.

### 3.1.3 Otimização do eletrólito de corrida e condições operacionais do método

As composições dos eletrólitos de corrida testados experimentalmente foram de 15 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol e 24 mmol L<sup>-1</sup> de ácido acético e 15 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol e 60 mmol L<sup>-1</sup> de ácido acético. Para ambos os eletrólitos foi adicionado o éter 18-coroa-6 de maneira que as concentrações finais de éter coroa variassem de 1 a 5 mmol L<sup>-1</sup>. A temperatura foi fixada em 25 °C e a voltagem utilizada foi de +30 kV (positivo no eletrodo que corresponde a extremidade de injeção dos cátions). A injeção das amostras contendo cátions e HNO<sub>3</sub> foi realizada com 100 mbar pela extremidade mais afastada da janela de detecção por tempos que variaram de 8 a 12 s. A injeção das amostras de GT e GL foram realizadas pela extremidade mais próxima da janela de detecção, por 5s e -50 mbar inicialmente. Também foi injetado um espaçador de eletrólito de corrida entre as amostras de GL e GT. O espaçador foi otimizado visualmente variando-se o tempo de injeção do espaçador entre 3 s a 5 s com pressões de injeção entre -10 mbar até -50 mbar. A ordem de injeção das amostras para o método foi: amostra de cátions, amostra de GT, espaçador de eletrólito e amostra de GL.

O capilar utilizado para separação não foi condicionado com 1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH como frequentemente é feito para não haver contaminação do capilar com Na<sup>+</sup>. O capilar foi condicionado a primeira vez com ácido trifluoracético 1 mol L<sup>-1</sup> por uma hora, com água deionizada por uma hora e com eletrólito de corrida por mais uma hora. O condicionamento *interday* do capilar foi realizado com 3 minutos de ácido trifluoracético 1 mol L<sup>-1</sup>, 10 minutos com água deionizada e 10 minutos com eletrólito de corrida. O pré-condicionamento entre as corridas foi realizado através da injeção do eletrólito de corrida por 1 minuto e pressão de 950 mbar.

Para evitar a contaminação dos *vials* que contém as amostras para medir cátions, durante a injeção das amostras referentes à GT e GL, foi posicionado um *vial* contendo 700 uL de água deionizada na extremidade do capilar onde a amostra de cátions foi injetada. Esse procedimento limpa a superfície do eletrodo para a próxima análise. O volume dos frascos que contém amostras de cátions também foi limitado a 300 µL pelo mesmo motivo. Os

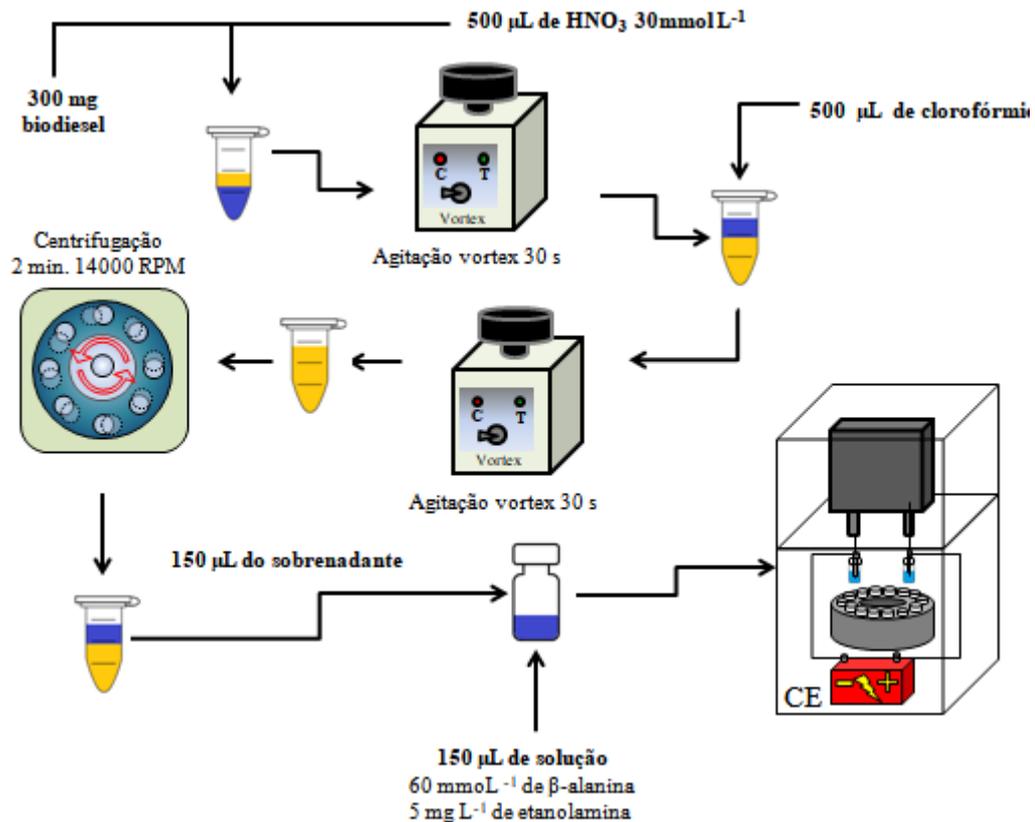
comprimentos de onda observados foram 220 nm (GT e GL) e 350 nm com referência em 208 nm (cátions).

### 3.1.4 Extração dos cátions

Primeiro foram otimizadas as condições de extração dos cátions. Para extração dos cátions, foi utilizada uma solução de ácido nítrico 30 mmol L<sup>-1</sup>. As amostras certificadas de biodiesel com concentrações de 5, 10 e 20 mg Kg<sup>-1</sup> de cada cátion foram utilizadas nessa etapa. O primeiro teste de extração foi realizado seguindo a proporção de 500 mg de biodiesel para 500 µL de solução de HNO<sub>3</sub> 30 mmol L<sup>-1</sup>. A mistura biodiesel : HNO<sub>3</sub> então foi agitada por 30 s (vortex) e 500 µL de clorofórmio foram adicionados a solução. A solução então foi agitada (vortex) por mais 30 s. Para separação das fases, as soluções foram centrifugadas a 14000 rpm por 2 minutos. Posteriormente foram coletados 150 µL do sobrenadante e inseridos em um *vial* de polipropileno. Para diluição da amostra, também foram adicionados 150 µL de solução contendo 60 mmol L<sup>-1</sup> de β-alanina e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de etanolamina no *vial*. Todas as amostras de certificadas de biodiesel para cátions passaram por esse procedimento de extração. As análises foram realizadas em triplicata. Valores de recuperação foram calculados para avaliar a extração dos cátions com ácido nítrico em função da concentração de cátion que as amostras apresentavam.

O segundo teste foi realizado utilizando diferentes massas da amostra certificada de 20 mg Kg<sup>-1</sup> de cátions, que variaram de 500 a 300 mg. Porém, o volume de solução de HNO<sub>3</sub> 30 mmol L<sup>-1</sup> utilizado na extração foi fixado em 500 µL para todas as massas de biodiesel pesadas. As demais etapas são similares às utilizadas no primeiro teste de extração. Valores de recuperação dos cátions também foram calculados para avaliar a eficiência da extração com volume fixo de ácido nítrico em função da massa de biodiesel pesada. A figura 7 é um fluxograma que apresenta as etapas necessárias para extração dos cátions nas condições já otimizadas.

Figura 7: Preparo de amostras para determinação de cátions em amostras de biodiesel.

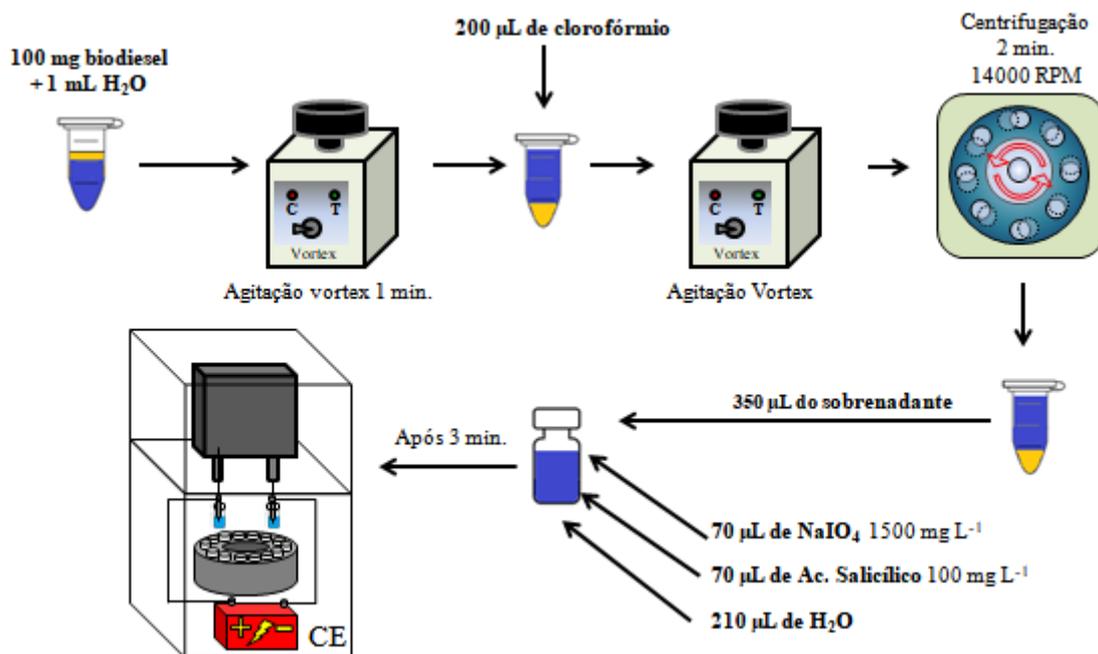


Fonte: O autor.

### 3.1.5 Preparo de amostra da glicerina livre

Para extração da glicerina livre, foi utilizado o procedimento experimental Gonçalves Filho e Micke (2007) com adaptações. Em um frasco *Eppendorf* foram pesados 100 mg de biodiesel. Em seguida, foi adicionado 1 mL de água deionizada no frasco. A solução foi agitada por 1 minuto e 200 µL de clorofórmio foram adicionados no frasco. A solução foi centrifugada por pelo menos 2 minutos a 14000 rpm e 350 µL do sobrenadante foram coletados e diluídos com 70 µL de solução de periodato 1500 mg L<sup>-1</sup>, 70 µL de solução de ácido salicílico 100 mg L<sup>-1</sup> e 210 µL de H<sub>2</sub>O deionizada. A amostra foi injetada após 3 minutos, para que a reação do periodato com a glicerina fosse completada. A figura 8 representa um fluxograma que descreve o preparo da amostra de GL.

Figura 8: Preparo de amostra para determinação de glicerina livre em amostras de biodiesel.

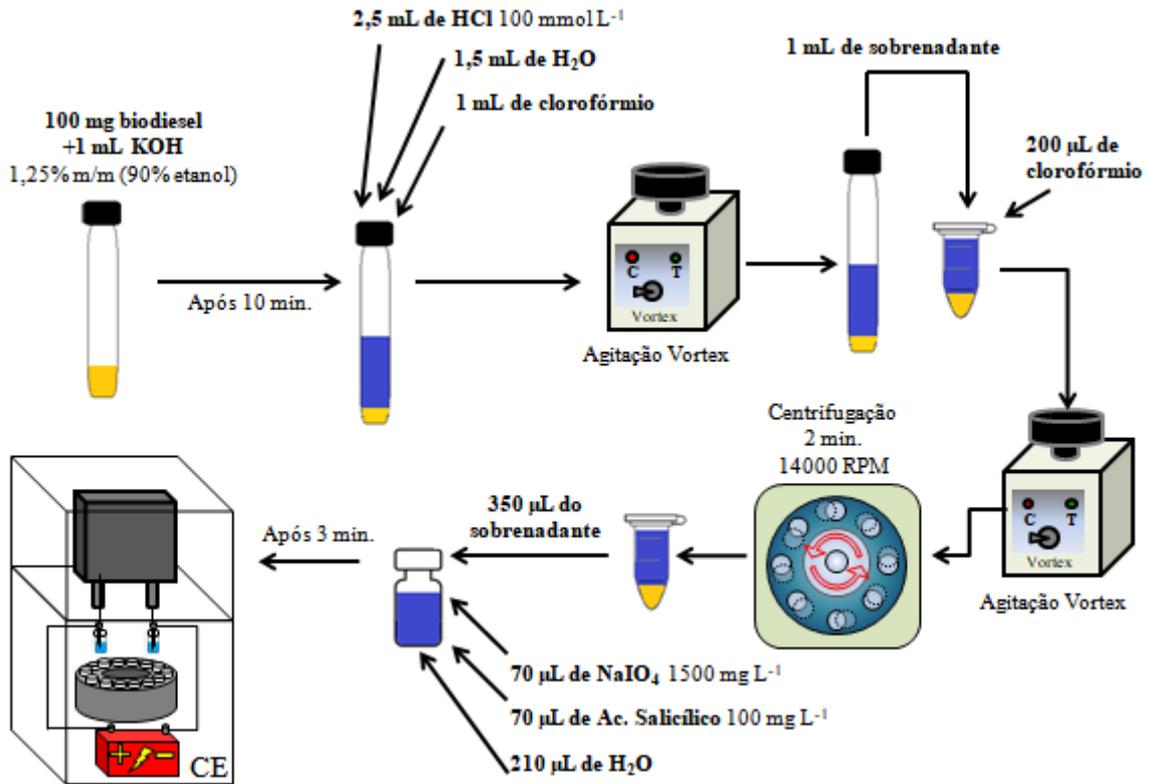


Fonte: O autor.

### 3.1.6 Preparo de amostra da glicerina total

O preparo de amostra de GT foi realizada através do método proposto por Spudeit (2013) com adaptações. Aproximadamente 100 mg de biodiesel foram pesados em um frasco de vidro. Uma alíquota (1 mL) de solução de KOH 1,25% m/m preparado com solvente EtOH:H<sub>2</sub>O 90:10 v/v foi transferida ao frasco. A solução foi agitada e, após 10 minutos de reação, foram adicionados 2,5 mL de HCl 100 mmol L<sup>-1</sup> e 1,5 mL de água deionizada no frasco. Após adição de 1 mL de clorofórmio, o frasco é agitado novamente. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante é transferido para um frasco *Eppendorf* e misturado com 200 µL de clorofórmio. O frasco *Eppendorf* então é agitado (vortex) e centrifugado a 14000 rpm por pelo menos 2 minutos. Após centrifugação, 350 µL do sobrenadante foram diluídos com 70 µL de periodato 1500 mg L<sup>-1</sup>, 70 µL de ácido salicílico 100 mg L<sup>-1</sup> e 210 µL de H<sub>2</sub>O deionizada. A solução então foi injetada após 3 minutos. A figura 9 representa um fluxograma que descreve o preparo da amostra de GT.

Figura 9: Preparo de amostra da glicerina total.



Fonte: O autor.

### 3.1.7 Condições instrumentais resumidas

Para facilitar a compreensão da configuração instrumental do método, a tabela 2 foi elaborada. A tabela 2 também descreve detalhes importantes que devem ser observados para melhor reprodutibilidade do método. Detalhes como: “nunca utilizar NaOH ou KOH para condicionar” o capilar são importantes pois, além do hidróxido hidrolisar grupos siloxano da sílica, também há contaminação do capilar com íons que devem ser quantificados. Em conjunto com as figuras 7, 8 e 9, que descrevem o preparo da amostra para cada parâmetro de qualidade, a tabela 2 apresenta uma visão geral e simplificada do método desenvolvido.

Tabela 2: Resumo detalhado das condições instrumentais e operacionais do método proposto.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor otimizado</b>	<b>Detalhes adicionais</b>
<b>Condicionamento inicial do capilar</b>	1 hora com ácido trifluoroacético 1 mol L <sup>-1</sup> 1 hora com água de ionizada 1 hora com eletrólito de corrida	Nunca utilizar NaOH ou KOH para condicionar.
<b>Eletrólito de corrida</b>	15 mmol L <sup>-1</sup> imidazol, 60 mmol L <sup>-1</sup> de ácido acético e 5 mmol L <sup>-1</sup> de éter 18 - coroa - 6, pH = 4,2	Repor após 40 corridas.
<b>Capilar de sílica revestido com poliimida</b>	52 cm com x 75 µm de diâmetro interno Comprimento efetivo para os cátions: 43,5 cm Comprimento efetivo para GT e GL: 8,5 cm	Nunca utilizar NaOH para condicionar.
<b>Etapa 1 Précondicionamento entre corridas</b>	1 minuto com eletrólito corrida utilizando aproximadamente 950 mbar	
<b>Etapa 2 injeção da amostra para medir cátions</b>	Injeção hidrodinâmica de 100 mbar por 10 s	<i>Vial</i> de amostra contém apenas 300 µL
<b>Etapa 3 Injeção da amostra para medir GT</b>	Injeção hidrodinâmica por 3s -25mbar. Volume de amostra no <i>vial</i> é de 700 uL	Durante a injeção, o <i>vial</i> mergulhado no eletrodo oposto tem 700 µL de água deionizada.
<b>Etapa 4 Injeção de espaçador entre a GT e GL</b>	Injeção hidrodinâmica por 4s -35mbar. Volume de eletrólito no <i>vial</i> é de 700 uL	Durante a injeção, o <i>vial</i> mergulhado no eletrodo oposto tem 700 µL de água deionizada. O <i>vial</i> de eletrólito utilizado como espaçador é exclusivo da etapa 4.
<b>Etapa 5 – Injeção da amostra para medir GL</b>	Injeção hidrodinâmica por 3s -50mbar Volume de amostra no <i>vial</i> é de 700 uL	Durante a injeção, o <i>vial</i> mergulhado no eletrodo oposto tem 700 µL de água deionizada.
<b>Voltagem de separação</b>	+30 KV positivo na extremidade de injeção dos cátions.	Configurado na aba <i>timetable</i> do <i>software</i> para aplicar no tempo 0 min +30 KV.  Os <i>vials</i> utilizados durante a aplicação da diferença de potencial têm 700 µL de eletrólito de corrida.
<b>Comprimento de onda observado</b>	λ= 220 nm para as GT E GL λ= 350 nm para os cátions	Após 1,4 minutos de corrida, a leitura dos cátions continua em 350 nm, mas a referência é alterada para 208 nm.
<b>Temperatura do cartucho</b>	25 °C	

Fonte: O autor.

### 3.1.8 Validação do método do método proposto

O método proposto foi validado em termos de linearidade, faixa linear, especificidade, precisão instrumental, precisão *intraday*, precisão *interday*, limite de quantificação e limite de detecção, desempenho interlaboratorial, reprodutibilidade e exatidão.

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação  $r^2$  na faixa de concentração de 0,25 - 5,0 mg L<sup>-1</sup> para os cátions e 2 - 35 mg L<sup>-1</sup> para GL e GT. Para todas as amostras de cátions, a concentração final de etanolamina (padrão interno) foi mantida em 2,5 mg L<sup>-1</sup>. Para as amostras de GT e GL, a concentração final de ácido salicílico foi mantida em 10 mg L<sup>-1</sup>. As áreas dos analitos são corrigidas através da razão entre a área do analito e a área do padrão interno. Os níveis das curvas de calibração foram preparados simulando as diferentes matrizes.

A precisão *intraday* foi realizada preparando-se cinco vezes o nível da curva de calibração correspondente a 0,5 mg L<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup> e Mg<sup>+2</sup> e cinco vezes para a GL e GT com concentrações de glicerina de 10 mg L<sup>-1</sup>. A precisão *interday* foi realizada em três dias aleatórios com os níveis da curva de calibração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup> e Mg<sup>+2</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup> de GL e GT. A precisão instrumental foi avaliada através de injeções consecutivas (n = 10) de um mesmo nível da curva. Os níveis das curvas selecionados foram de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup> e Mg<sup>+2</sup> e 35 mg L<sup>-1</sup> para GT e GL. Os parâmetros de precisão foram avaliados pelos coeficientes de variação (% CV) obtidos. Os limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) foram avaliados pela relação sinal-ruído 10:1 e 3:1, respectivamente. O ruído foi estimado pelo desvio padrão da linha base no comprimento de onda 220 nm para GT e GL, e 350 nm com referencia em 208 nm para K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup> e Mg<sup>+2</sup>.

A exatidão foi avaliada através de comparação estatística utilizando o teste-t, onde os valores obtidos por eletroforese capilar foram comparados aos valores da amostra interlaboratorial. A amostra ABL de biodiesel também foi utilizada para verificação da exatidão do método para os parâmetros de GL e GT.

O desempenho interlaboratorial do método foi avaliado através do *Z-score*. Quatro analistas diferentes realizaram a análise da amostra interlaboratorial em quatro laboratórios diferentes. Os laboratórios participantes estão localizados no departamento de Química da UFSC, no departamento de farmácia da UFSC, no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em Florianópolis e na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) em Itajaí.

A Reprodutibilidade do método foi avaliada através da precisão interlaboratorial e os valores coeficientes de variação obtidos para os analitos foram comparados aos valores previstos pela equação de *Horwitz*. A precisão *intraday* (repetibilidade) dos quatro analistas diferentes também foram avaliadas através da análise da amostra interlaboratorial. Os

coeficientes de variação obtidos foram comparados aos valores previstos equação de *Horwitz* modificada para repetibilidade.

### 3.1.9 Método para transformação dos eletroferogramas em mobilidades efetivas

No programa *Peakmaster 5.3*, foram configurados os parâmetros instrumentais como voltagem de separação ( $V = 30 \text{ kV}$ ), comprimento total de separação ( $L_{\text{tot}} = 52 \text{ cm}$ ), comprimento efetivo de separação ( $L_{\text{det}} = 43,5 \text{ cm}$ ) e composição do eletrólito de corrida ( $15 \text{ mmol L}^{-1}$  e imidazol e ácido acético  $60 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Como analito de referência foi escolhido a etanolamina. Então, valores de mobilidade de fluxo eletrosmótico ( $\mu_{\text{EOF}}$ ) foram escolhidos entre a faixa de 0 a  $+22,5$  ( $10^{-5} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) em intervalos de  $0,5$  ( $10^{-5} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Para cada  $\mu_{\text{EOF}}$  escolhido foi calculado o tempo de migração da etanolamina ( $t_{\text{m ET}}$ ). Uma curva de regressão foi então obtida a partir dos resultados simulados.

Para transformação do eixo do eletroferograma de tempo de migração para mobilidade efetiva ( $\mu_{\text{eff}}$ ), os eletroferogramas foram exportados do *software Chemstation* para o *software Excel* em arquivo de extensão *.csv*. O arquivo do *Excel* apresentou duas colunas referentes ao sinal e tempo de migração de cada ponto exportado do eletroferograma. Através da equação 5 e 6 foram calculadas as mobilidades efetivas de cada ponto exportado. Na equação 6, o valor de  $\mu_{\text{EOF}}$  é dada equação da curva de  $\mu_{\text{EOF}}$  vs  $t_{\text{m ET}}$  (equação 18). Então, os valores de  $t_{\text{m}}$  foram substituídos por valores de  $\mu_{\text{eff}}$  e os eletroferogramas foram construídos no próprio *software Excel*.

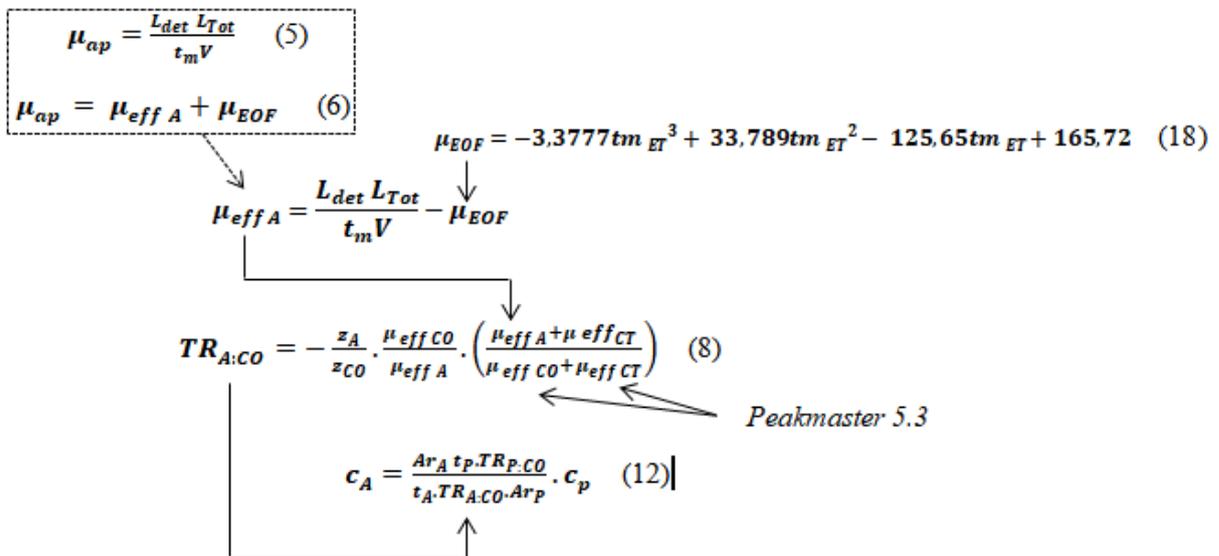
Esse procedimento foi realizado para os eletroferogramas obtidos das análises da amostra interlaboratorial em quatro laboratórios diferentes. Para verificar a eficiência da correção dos eletroferogramas por mobilidade efetiva, valores de coeficiente de variação foram calculados através das mobilidades efetivas obtidas para cada analito de interesse.

### 3.1.10 Método sem calibração para determinação de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{+2}$ , $\text{Mg}^{+2}$ por CZE-UV

Para cálculo das concentrações de cátions, foi calculado primeiro a razão de transferência entre o co-íon e o analito ( $TR_{\text{A:CO}}$ ) dada pela equação 8. A equação 8 depende de valores de mobilidade efetiva do analito ( $\mu_{\text{eff A}}$ ), do co-íon ( $\mu_{\text{eff CO}}$ ) e do contra-íon ( $\mu_{\text{eff CT}}$ ).

Para cálculos de  $\mu_{\text{eff CO}}$  e  $\mu_{\text{eff CT}}$  foi utilizado o programa *Peakmaster 5.3* configurado com a composição do eletrólito de corrida real, mas sem éter coroa. A  $\mu_{\text{eff A}}$  pode ser calculada através das equações 5 e 6. Porém, para cálculo de  $\mu_{\text{eff A}}$ , também é necessário conhecer o valor de  $\mu_{\text{EOF}}$ . O tempo de migração experimental da etanolamina ( $t_{m \text{ ET}}$ ) foi utilizado na equação 18 para cálculo de  $\mu_{\text{EOF}}$  e o valor obtido foi utilizado para cálculos de  $\mu_{\text{eff A}}$  experimentais através das equações 5 e 6. A concentração do analito é calculada através da equação 12. O fluxograma representado na figura 10 mostra as equações necessárias para o cálculo de concentração dos cátions sem calibração.

Figura 10: Fluxograma para cálculo da concentração dos cátions.



Fonte: O autor.

Na equação 12, a concentração de padrão interno ( $c_p$ ) tem unidade de  $\text{mol L}^{-1}$ . Portanto, a concentração obtida para cada analito nas amostras é corrigida para unidades de  $\text{mg Kg}^{-1}$ . As concentrações foram calculadas a partir dos eletroferogramas obtidos para a amostra interlaboratorial em quatro laboratórios diferentes. Estudos estatísticos foram realizados através do teste-t para verificar se os valores obtidos pelo método sem calibração apresentava resultados estatisticamente equivalentes aos valores de referência da amostra interlaboratorial.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE INJEÇÃO DAS AMOSTRAS

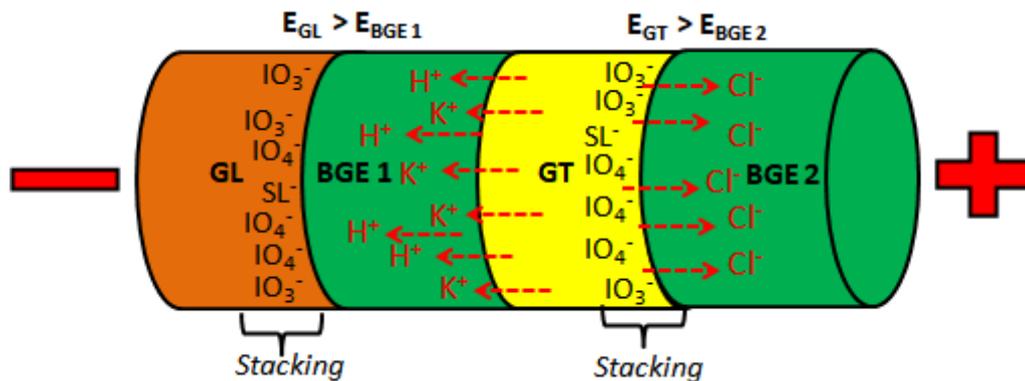
As etapas de injeção foram configuradas priorizando a velocidade instrumental e a eficiência da separação. No método desenvolvido, os cátions são injetados primeiro, com tempo e pressão de injeção superiores aos selecionados para a injeção de GL e GT. Quando as amostras de GT e GL são injetadas, parte do volume injetado referente à amostra de cátions é empurrado para fora do capilar. Caso as amostras de GT e GL fossem injetadas primeiro, o tempo de injeção dos cátions deveria ser maior, pois uma pressão de injeção relativamente alta poderia promover a junção das zonas de GT e GL. Também seria necessário injetar eletrólito após as injeções de GT e GL, pois a injeção de cátions pela outra extremidade do capilar descartaria o volume injetado de GT e GL. A injeção de eletrólito de corrida após as injeções de GT e GL aumentaria o tempo de análise, pois existiria uma etapa a mais de troca de *vials* e injeção de eletrólito. Portanto, injetar a amostra de cátions primeiro e em excesso reduz o tempo instrumental, pois as etapas de troca de *vials* e etapas de injeção são reduzidas.

Em relação à injeção de cátions, o tempo e pressão selecionados para desenvolvimento do método foi de 10 s e 100mbar. A maior pressão de injeção que é possível configurar no *software* de análise é 100 mbar e o tempo de 10 s foi escolhido porque apresenta sinais satisfatórios e alargamento ínfimo dos picos. Quando 12 s são utilizados, apesar da intensidade dos picos aumentarem nos menores níveis da curva de calibração, existe alargamento de base e achatamento dos picos nos maiores níveis da curva de calibração.

A segunda etapa de injeção foi a injeção da amostra GT. Diferentemente do trabalho proposto por Spudeit em 2012, a ordem das injeções fez diferença nesse método. Quando a injeção de amostra de GL é realizada antes da GT, os picos dos analitos praticamente desaparecem em uma região onde a linha base do eletroferograma não é constante. Porém, ao realizar a injeção da amostra de GT antes da amostra de GL, os picos são observados novamente. Esse efeito pode estar correlacionado ao que ocorre em isotacoforese transiente e está representado na figura 12. Quando uma diferença de potencial é aplicada, íons  $K^+$  e  $H^+$  da zona da GT migram em direção ao eletrodo de carga negativa e temporariamente encontram-se na região de eletrólito injetado entre a amostra de GT e GL (BGE 1). Nesse momento, o

campo elétrico local em BGE 1 ( $E_{BGE1}$ ) é inferior ao campo elétrico na zona de GL ( $E_{GL}$ ), pois há um aumento de condutividade daquela região. Como a força iônica do eletrólito aumenta, os analitos encontrados na zona de GL tem a velocidade reduzida ao atingir a interface entre a zona de amostra de GL e a zona de BGE1. Assim, os analitos da amostra de GL são “empacotados” em um processo de *stacking* e os picos aparecem normalmente. Devido ao deslocamento rápido dos íons  $K^+$  e  $H^+$  para a zona de BGE 1 e de  $Cl^-$  para a zona de BGE 2, o campo elétrico local em BGE 2 ( $E_{BGE2}$ ) é temporariamente inferior ao campo elétrico local da zona de GT ( $E_{GT}$ ) e o mesmo processo de *stacking* também ocorre para os íons da GT.

Figura 11: Processo de *Stacking* que ocorre devido rápido descolamento de íons  $K^+$ ,  $H^+$  e  $Cl^-$ .



Legenda: BGE1— eletrólito de corrida na zona 1; BGE2 — eletrólito de corrida na zona;  $E_{BGE1}$  — campo elétrico local em BGE1;  $E_{BGE2}$  — campo elétrico local em BGE2;  $E_{GL}$  — campo elétrico local na zona de GL;  $E_{GT}$  — campo elétrico local na zona de GT;  $SL^-$  — íon salicilato.

Fonte: O autor.

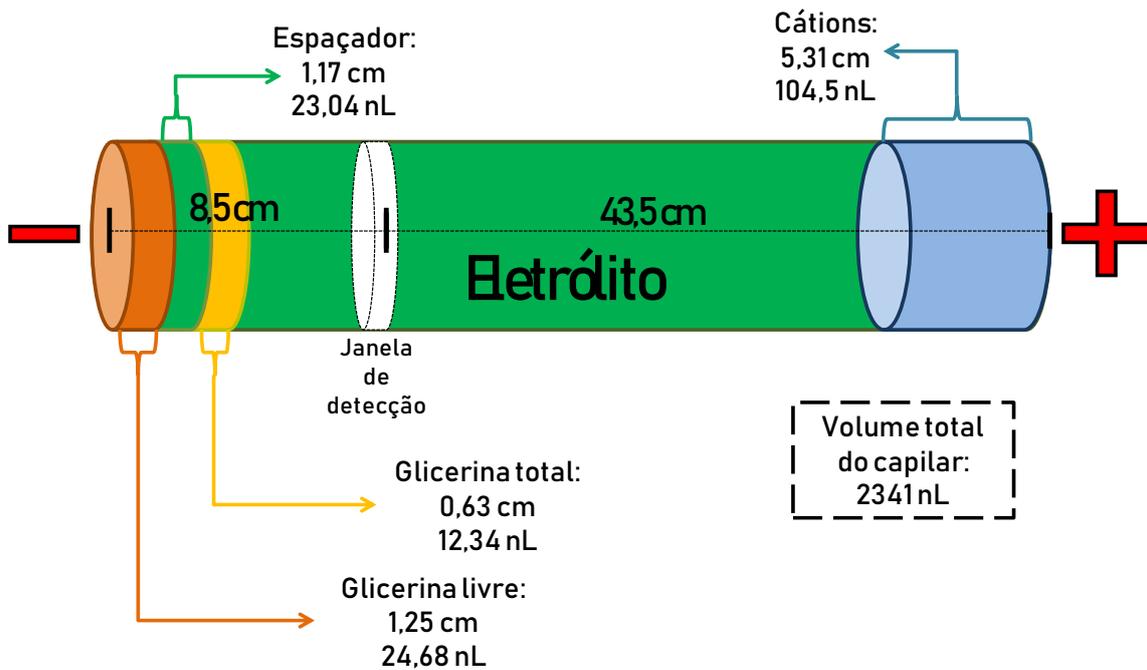
A terceira etapa de injeção é a injeção do *plug* de eletrólito de corrida que separa as amostras de GT e GL. Sem esse separador, não é possível distinguir os picos referentes à GT e GL, pois ambas são quantificadas através do mesmo ânion ( $IO_3^-$ ) e apresentam o mesmo padrão interno ( $SL^-$ ).

A quarta etapa de injeção é a injeção da amostra de GL. A amostra de GL é a que contém menor quantidade de componentes em sua matriz. Apesar disso, não é possível injetar grandes volumes dessa amostra. A injeção de grandes volumes deslocaria a amostra de GT para mais perto da janela de detecção e o comprimento efetivo de separação para GT seria reduzido.

Como informação adicional, a figura 13 foi elaborada para mostrar os volumes de injeção e tamanhos dos *plugs* das amostras inseridas no capilar. Os cálculos foram realizados com o auxílio da ferramenta virtual *CE Expert Lite* e os valores são aproximações. Na figura

13 também foi considerado o descarte de parte do volume da amostra de cátions ao injetar as amostras de GT e GL pela outra extremidade do capilar.

Figura 12: Representação do capilar e os volumes de injeção estimados de cada amostra no método proposto.



Fonte: O autor.

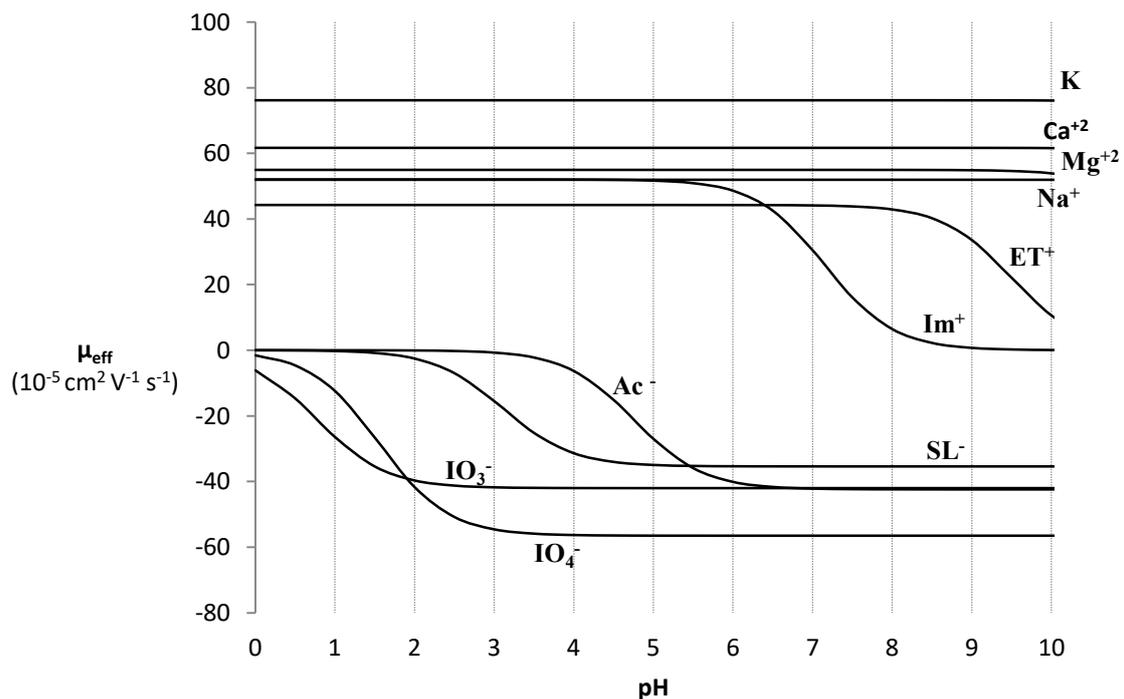
Os valores da figura 13 são aproximados, pois a viscosidade das amostras e do eletrólito de corrida são consideradas iguais à viscosidade da água. Os volumes injetados das amostras também podem sofrer variações. Caso o volume de amostra injetada sofra variações, também há variação nas áreas dos picos. Por isso, foi adicionado um padrão interno em concentração conhecida e que permite realizar correção dos volumes injetados. A correção é realizada através da razão entre as áreas dos picos dos analitos e do padrão interno.

#### 4.2 OTIMIZAÇÃO DO ELETRÓLITO DE CORRIDA

Para que a separação dos analitos ocorra, os mesmos devem apresentar mobilidades efetivas diferentes. A figura 14 representa curvas de mobilidades efetivas construídas através da equação 3. Porém, para evitar a adsorção de cátions na superfície da sílica ou mesmo a sua

precipitação, valores de pH básico não foram considerados como opção para análise. Em valores de pH básicos a velocidade do fluxo eletrosmótico também é alto, o que pode prejudicar a análise de GT e GL. Caso a velocidade do fluxo supere a velocidade dos ânions, eles não aparecerão no eletroferograma, pois serão carregados em direção ao mesmo eletrodo pelo qual foram injetados. Em valores de pH inferiores a 3, as mobilidades efetivas dos íons  $\text{IO}_3^-$  e  $\text{IO}_4^-$  diminuem. Portanto, uma faixa de trabalho interessante é entre pH 4 - 5. O íon  $\text{SL}^-$  representa o íon salicilato e também está representado na figura 14, pois ele foi utilizado como padrão interno para a análise. Em valores de pH entre 4 - 5, praticamente todos os analitos estão em sua forma ionizada e com mobilidade constante.

Figura 13: Curvas de mobilidades efetivas ( $\mu_{\text{eff}}$ ) dos analitos vs pH. Para cálculo de  $\mu_{\text{eff}}$ , não foram considerados efeitos de força iônica.



Legenda:  $\text{ET}^+$  — etanolamina protonada ;  $\text{Im}^+$  — imidazol protonado;  $\text{Ac}^-$  — acetato;  $\text{SL}^-$  — salicilato.

Fonte: O autor.

O eletrólito utilizado por Spudeit em 2012 era composto por  $120 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido acético e  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  de imidazol que resulta em um pH de 3,86. Ao trocar a composição do eletrólito para  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido acético e  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  de imidazol, o pH do eletrólito aumenta para 4,23. A tabela 3 apresenta valores simulados no programa *Peakmaster 5.3* para

valores de gradiente de velocidade relativa ( $S_A$ ), mobilidade efetiva ( $\mu_{\text{eff}}$ ) e tempo de migração dos analitos. A simulação foi realizada utilizando um comprimento com  $L_{\text{Tot}} = 52$  cm, com  $L_{\text{det}} = 43,5$  cm para os cátions e  $L_{\text{det}} = 8,5$  cm para os ânions. O valor do fluxo eletrosmótico foi considerado zero e a voltagem simulada foi de 30 kV.

Tabela 3: Valores de gradiente velocidade relativa ( $S_A$ ), mobilidade efetiva ( $\mu_{\text{eff}}$ ) e tempo de migração simulados no programa *Peakmaster 5.3* para os íons de interesse.

Íon	$S_A$ ( $10^{-3} \text{ Sm}^2\text{mol}^{-1}$ )	$\mu_{\text{eff}}$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	Tempo de migração (min)
$\text{IO}_4^-$	-2,731	-51,58	0,48
$\text{IO}_3^-$	-0,271	-37,75	0,65
$\text{SL}^-$	0,627	-29,43	0,83
$\text{Ac}^-$	X	-9,57	x
$\text{K}^+$	-3,486	+70,71	1,79
$\text{Ca}^{+2}$	-1,18	+50,91	2,48
$\text{Na}^+$	0,008	+47,43	2,65
$\text{Mg}^{+2}$	0,907	+44,98	2,78
$\text{ET}^+$	1,421	+40,11	3,12
$\text{Im}^+$	X	+47,77	x

Eletrólito simulado: 60 mmol  $\text{L}^{-1}$  de ácido acético e 15 mmol  $\text{L}^{-1}$  de imidazol.

Legenda:  $\text{ET}^+$  – etanolamina protonada;  $\text{Im}^+$  – imidazol protonado;  $\text{Ac}^-$  – acetato;  $\text{SL}^-$  – salicilato.

Fonte: O autor.

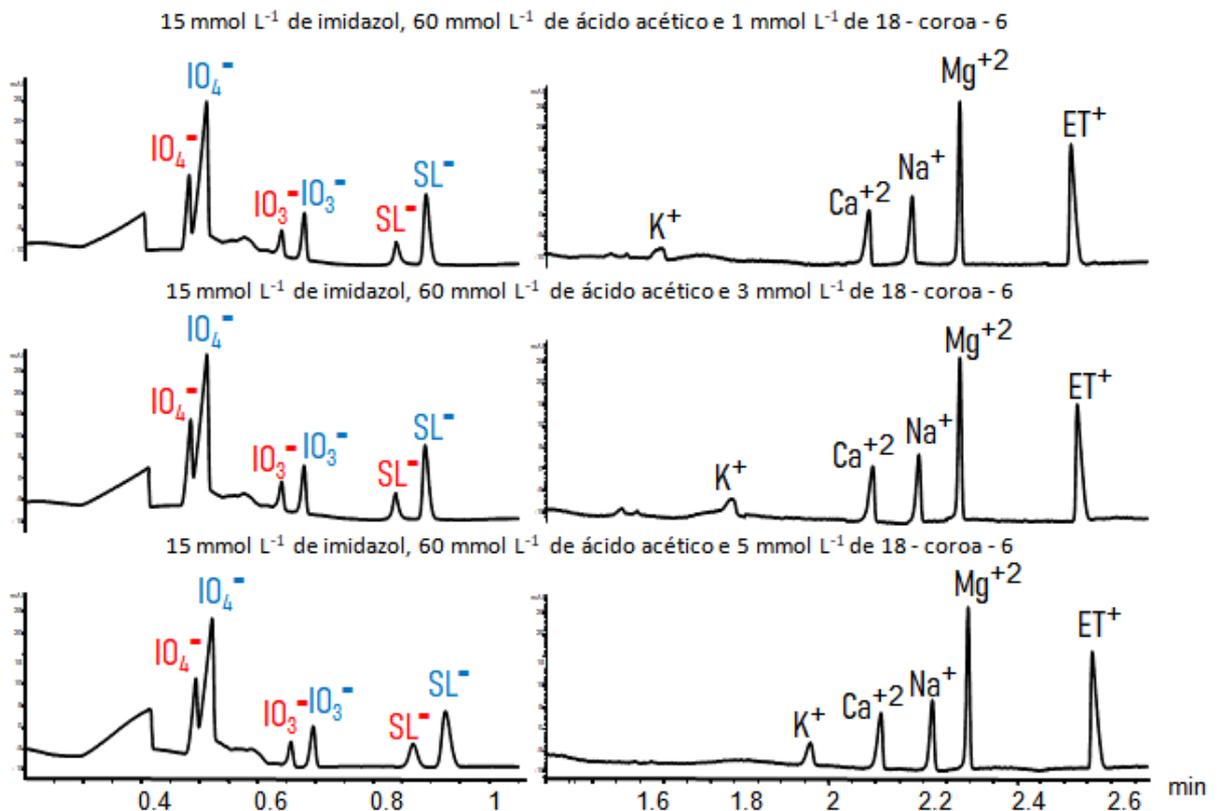
A simulação pelo programa *Peakmaster 5.3* mostra que o íon  $\text{Mg}^{+2}$  tem menor tempo de migração que o  $\text{Na}^+$ . Observando a figura 14, esperava-se que o  $\text{Mg}^{+2}$  migrasse antes que o  $\text{Na}^+$ , pois sua  $\mu_{\text{eff}}$  era maior. Porém, o efeito da força iônica sobre a  $\mu_{\text{eff}}$  dos íons é considerada durante a simulação pelo programa, e a  $\mu_{\text{eff}}$  do  $\text{Mg}^{+2}$  sofre uma redução de aproximadamente 20 %. Experimentalmente, a inversão na ordem de migração do  $\text{Na}^+$  e  $\text{Mg}^{+2}$  também foi observada.

A tabela 3 também mostra que a  $\mu_{\text{eff}}$  do íon acetato (co-íon para os ânions) é muito inferior aos valores de  $\mu_{\text{eff}}$  dos ânions de interesse ( $\text{IO}_3^-$  e  $\text{SL}^-$ ). Como discutido na seção 1.5.4.3, esse é um exemplo de situação onde  $\mu_{\text{eff CO}} \neq \mu_{\text{eff A}}$ , mas o pico ainda é simétrico, pois os valores de  $S_A$  dos picos são próximos de zero. Porém, para os cátions, nota-se que a  $S_A$  tem

relação com a proximidade das  $\mu_{\text{eff CO}}$  e  $\mu_{\text{eff A}}$ , pois quanto mais próximo é  $\mu_{\text{eff A}}$  em relação  $\mu_{\text{eff CO}}$ , mais próximo de zero é o valor de  $S_A$ . Resultados experimentais (figura 15) comprovaram que a dispersão por eletromigração é baixa, pois os picos de interesse não apresentaram o alargamento característico.

A tabela 3 também mostra que o maior valor de  $S_A$  é o do  $\text{K}^+$ . Portanto, o pico referente ao  $\text{K}^+$  apresenta baixa intensidade e formato triangular. A simetria do pico do  $\text{K}^+$  pode ser melhorada com a adição do composto 18-coroa-6 no eletrólito de corrida. O 18-coroa-6 tem seis oxigênios que interagem com o  $\text{K}^+$  no interior da coroa, pois o diâmetro interno do éter coroa é entre 260 a 320 pm, enquanto o  $\text{K}^+$  tem raio iônico de 266 pm (BOYCE, 1999). A figura 15 representa três eletroferogramas diferentes, onde concentrações de 1, 3 e 5  $\text{mmol L}^{-1}$  de éter coroa foram adicionados ao eletrólito.

Figura 14: Eletroferogramas obtidos utilizando concentrações diferentes de 18 - coroa - 6.



Legenda: Em **vermelho**, íons referentes à **GT**. Em **azul**, íons referentes à **GL**.

$\text{SL}^-$  — salicilato,  $\text{ET}^+$  — etanolamina protonada.

Fonte: O autor.

De acordo com a figura 15, quando a concentração de 18-coroa-6 aumenta, o tempo de migração do  $\text{K}^+$  aumenta e a dispersão por eletromigração do pico é reduzida. A adição de

18-coroa-6 ao eletrólito é interessante porque o pico do  $K^+$  é o menor entre todos os cátions. Porém, espera-se que o  $K^+$  seja encontrado com certa frequência em amostras de biodiesel por se tratar de um catalisador frequentemente utilizado na produção do combustível. Portanto, com a melhora na intensidade do sinal do  $K^+$ , menores quantidades de  $K^+$  podem ser detectadas nas amostras. Nenhum efeito considerável do 18-coroa-6 foi observado sobre os outros analitos, pois não houve alteração significativa nos tempos de migração.

Portanto, para validação do método, foi utilizado o eletrólito de corrida composto por 60 mmol L<sup>-1</sup> de ácido acético, 15 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol e 5 mmol L<sup>-1</sup> de 18-coroa-6. Nessas condições, os picos de interesse apresentam baixa dispersão por eletromigração, tempo de migração inferior a 3 minutos e resolução satisfatória entre os picos.

### 4.3 ANÁLISE DE CÁTIONS

#### 4.3.1 Otimização da extração dos cátions

A extração dos cátions foi realizada em meio ácido e, para simplificação do método, nenhum processo de aquecimento ou sonicação foi utilizado. O meio ácido é utilizado para realizar uma troca iônica, onde os cátions que estão interagindo com algum componente do biodiesel são trocados por prótons. Ao adicionar ácido ao biodiesel, os cátions são transferidos da fase orgânica do biodiesel para a fase aquosa ácida de maior polaridade.

O procedimento de extração foi realizado inicialmente seguindo a proporção de 500 mg de biodiesel para 500 µL de HNO<sub>3</sub> 30 mmol L<sup>-1</sup>. A tabela 4 mostra as concentrações calculadas de amostras certificadas de 5, 10 e 20 mg Kg<sup>-1</sup> de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup>.

De acordo com a tabela 4, os melhores valores obtidos foram para a extração de K<sup>+</sup> e o Mg<sup>+2</sup>, onde as recuperações foram superiores a 88%. A extração do Ca<sup>+2</sup> foi satisfatória até a amostra certificada de 10 mg Kg<sup>-1</sup>, onde a recuperação chegou a 87%. Porém, a recuperação de Ca<sup>+2</sup> na amostra de 20 mg kg<sup>-1</sup> foi de apenas 66%, evidenciando a saturação do meio aquoso com o íon. Concentrações superiores aos valores de referência foram obtidas para o Na<sup>+</sup>, principalmente na amostra de 5 mg kg<sup>-1</sup>. O erro na concentração de Na<sup>+</sup> pode ser proveniente de contaminação do eletrodo entre as corridas ou adsorção de Na<sup>+</sup> na superfície de sílica do capilar.

Tabela 4: Concentrações dos cátions encontrados em amostras certificadas.

Amostra certificada	Concentração encontrada (mg Kg <sup>-1</sup> )			
	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>
5 mg Kg <sup>-1</sup>	5,2 ± 0,3	5,0 ± 0,2	6,80 ± 0,02	5,2 ± 0,3
10 mg Kg <sup>-1</sup>	9,8 ± 0,1	8,8 ± 0,4	11,5 ± 0,3	9,6 ± 0,2
20 mg Kg <sup>-1</sup>	18,0 ± 0,4	13 ± 1	20,2 ± 0,4	17,6 ± 0,3
	Recuperação (%)			
5 mg kg <sup>-1</sup>	105 ± 6	100 ± 5	143 ± 10	105 ± 3
10 mg kg <sup>-1</sup>	98 ± 1	87 ± 4	115 ± 3	96 ± 2
20 mg kg <sup>-1</sup>	90 ± 2	66 ± 5	101 ± 2	88 ± 1

Fonte: O autor.

Para verificar se existe diferença na eficiência da extração em relação à variação de massa de biodiesel, foram testadas massas de 500 a 300 mg biodiesel, extraídas com 500 µL de HNO<sub>3</sub>. Os resultados estão resumidos na tabela 5. Como a recuperação da amostra de 20 mg kg<sup>-1</sup> foi menor em todos os casos da tabela 4, apenas a amostra de 20 mg kg<sup>-1</sup> foi utilizada para esse novo estudo.

De acordo com a tabela 5, as recuperações de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> e Mg<sup>+2</sup> são superiores a 88% independentemente da massa de biodiesel utilizada na extração. Para o Ca<sup>+2</sup>, a recuperação com 500 mg de biodiesel é de apenas 66%. Porém, ao reduzir a massa de biodiesel para 300 mg, a recuperação do analito chega a 93%, sendo esse um valor satisfatório. Não é interessante reduzir mais a massa do biodiesel devido aos limites que são estipulados pela ANP. Com a diluição atual, uma amostra de biodiesel contendo 1 mg Kg<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup>, após as etapas de extração e diluição para injeção no sistema de separação, apresentará uma concentração de apenas 0,3 mg L<sup>-1</sup>. Concentrações inferiores a esse valor estão próximas ao limite de quantificação do método. Portanto, a proporção de massa de biodiesel e solução de ácido nítrico selecionada para o desenvolvimento do método foi de 300 mg de biodiesel e 500 µL de HNO<sub>3</sub> 30 mmol L<sup>-1</sup>.

Tabela 5: Concentrações de cátions encontradas em diferentes massas de biodiesel utilizando um volume fixo de 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  30  $\text{mmol L}^{-1}$  como solvente extrator.

Massa de amostra <sup>a</sup>	Concentração encontrada ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )			
	$\text{K}^+$	$\text{Ca}^{+2}$	$\text{Na}^+$	$\text{Mg}^{+2}$
500 mg	$18,0 \pm 0,4$	$13 \pm 1$	$20,2 \pm 0,4$	$17,6 \pm 0,3$
400 mg	$19,7 \pm 0,2$	$17,6 \pm 0,5$	$22,5 \pm 0,1$	$19,5 \pm 0,2$
300 mg	$19,4 \pm 0,3$	$18 \pm 1$	$22,2 \pm 0,4$	$19,0 \pm 0,3$
	Recuperação (%)			
500 mg	$90 \pm 2$	$66 \pm 5$	$101 \pm 2$	$88 \pm 1$
400 mg	$99 \pm 1$	$88 \pm 2$	$112,5 \pm 0,4$	$97 \pm 1$
300 mg	$97 \pm 2$	$93 \pm 4$	$111 \pm 2$	$96 \pm 1$

<sup>a</sup> massa da amostra certificada de biodiesel contendo 20  $\text{mg Kg}^{-1}$  de cátions.

Fonte: O autor.

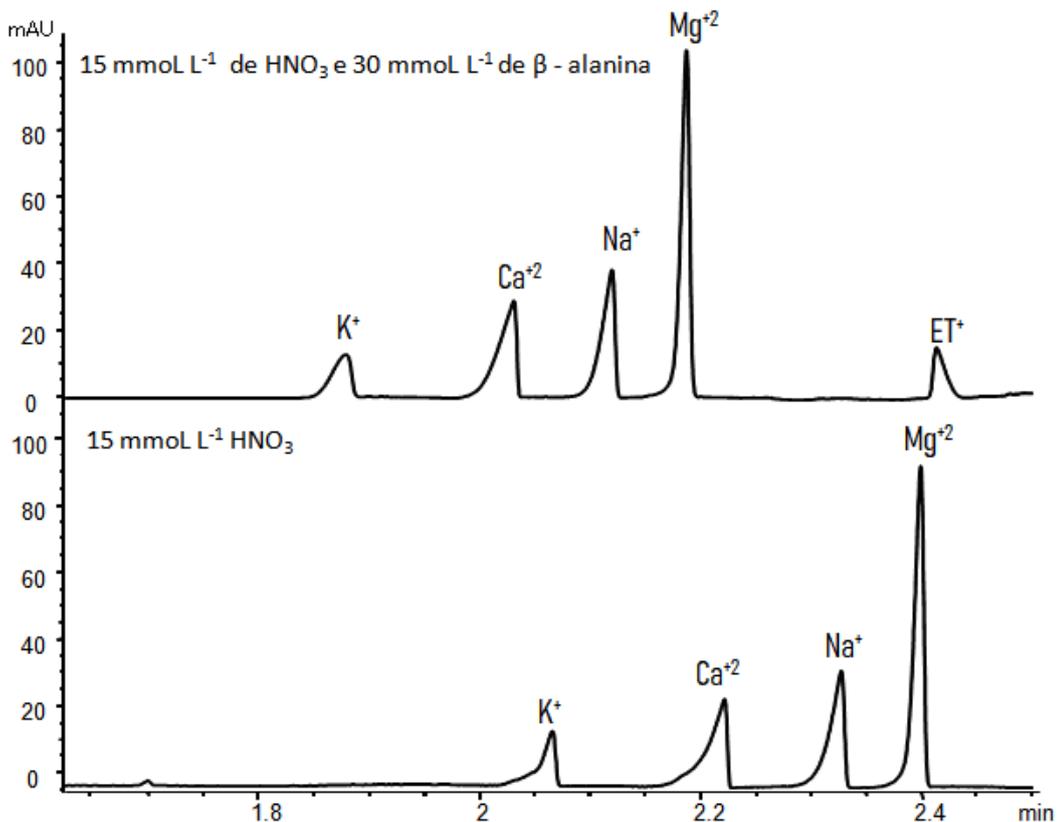
#### 4.3.2 Preparo de amostra para injeção dos cátions

Para extração dos cátions foi necessário utilizar solução de 30  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$ . Maiores concentrações de  $\text{HNO}_3$  não foram testadas porque a condutividade da zona da amostra aumentaria, provocando alargamento dos picos. Para reduzir a condutividade da amostra diluições podem ser realizadas. Porém os sinais dos analitos também serão reduzidos, dificultando o cálculo de concentrações de cátions abaixo dos limites estipulados pela resolução da ANP. De acordo com o programa *Peakmaster 5.3*, se a diluição da amostra for de duas vezes, a condutividade simulada é  $0,610 \text{ Sm}^{-1}$ . A condutividade simulada do eletrólito de corrida utilizado na separação dos analitos é de apenas  $0,126 \text{ S m}^{-1}$ . Portanto efeitos de alargamento de picos podem acontecer.

Para reduzir a condutividade, pode-se adicionar à amostra um composto químico. O íon  $\text{H}^+$  tem mobilidade efetiva elevada e é o maior responsável pela alta condutividade da zona da amostra. Portanto, pode-se adicionar uma base para capturar o íon  $\text{H}^+$ . Porém, o aumento de pH também promove a ionização da sílica e a adsorção de cátions sobre a superfície do capilar será maior.

Outra opção é adicionar um composto no eletrólito capaz de capturar os prótons e tamponar o pH da zona de amostra em um pH ainda ácido. Se for adicionado um aminoácido, o grupo amino pode capturar os íons  $H^+$  e ainda manter o pH ácido da amostra. O aminoácido adicionado à amostra foi a  $\beta$ -alanina que apresenta valores de pKa de 3,3 e 10,2. Em  $pH = 3,3$  a  $\mu_{eff}$  da  $\beta$ -alanina é de aproximadamente  $15 (10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$  (HIROKAWA; GOJO; KISO, 1986). Simulações no programa *Peakmaster 5.3* também mostraram que uma solução composta por  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $HNO_3$  e  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\beta$ -alanina tem  $pH$  de 3,5 e condutividade de  $0,160 \text{ S m}^{-1}$ . A  $\mu_{eff}$  simulada da  $\beta$ -alanina foi igual a  $16,8 (10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$ . Portanto, após a extração dos cátions do biodiesel com  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $HNO_3$ , a fase aquosa pode ser diluída na proporção de 1:1 v/v com uma solução de  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\beta$ -alanina. A condutividade da amostra então é reduzida de 0,610 para  $0,160 \text{ S m}^{-1}$  e, como a  $\mu_{eff}$  da  $\beta$ -alanina protonada é muito inferior as  $\mu_{eff}$  dos cátions de interesse, não há comigração. Os efeitos da adição de  $\beta$ -alanina podem ser observados na figura 16, onde foram injetadas soluções contendo  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  e  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de etanolamina.

Figura 15: Efeito produzido pela adição de  $\beta$ -alanina à amostra que contém  $HNO_3$ .



Legenda: ET<sup>+</sup> — etanolamina protonada.

Fonte: O autor.

Na figura 16, no eletroferograma onde a  $\beta$ -alanina está presente na amostra, o alargamento frontal do pico do íon  $K^+$  foi eficientemente reduzido. O íon  $Ca^{+2}$  também tem o alargamento reduzido, mas o efeito é melhor observado no  $K^+$ , que é o íon mais afetado pela dispersão por eletromigração. O efeito da condutividade da amostra não foi muito significativo para os íons  $Na^+$  e  $Mg^{+2}$ .

#### 4.4 ANÁLISE DA GLICERINA LIVRE

A análise da GL é baseada em fundamentos simples. Primeiro, realiza-se uma extração da glicerina livre com água deionizada e a fase aquosa é separada da fase orgânica (clorofórmio e biodiesel). Após a centrifugação, o sobrenadante é coletado e posteriormente existem etapas de adição de  $IO_4^-$  e ácido salicílico para que a amostra seja injetada. A reação entre  $IO_4^-$  é realizada porque a glicerina não tem carga e não absorve no UV. Portanto, a glicerina é medida através da formação do íon  $IO_3^-$ . Não é necessário fazer conversões estequiométricas para o cálculo da glicerina através de  $IO_3^-$ . As curvas de calibração são preparadas adicionando  $IO_4^-$  em excesso em diferentes concentrações de glicerina. A área obtida do pico  $IO_3^-$  é proporcional à quantidade de glicerina.

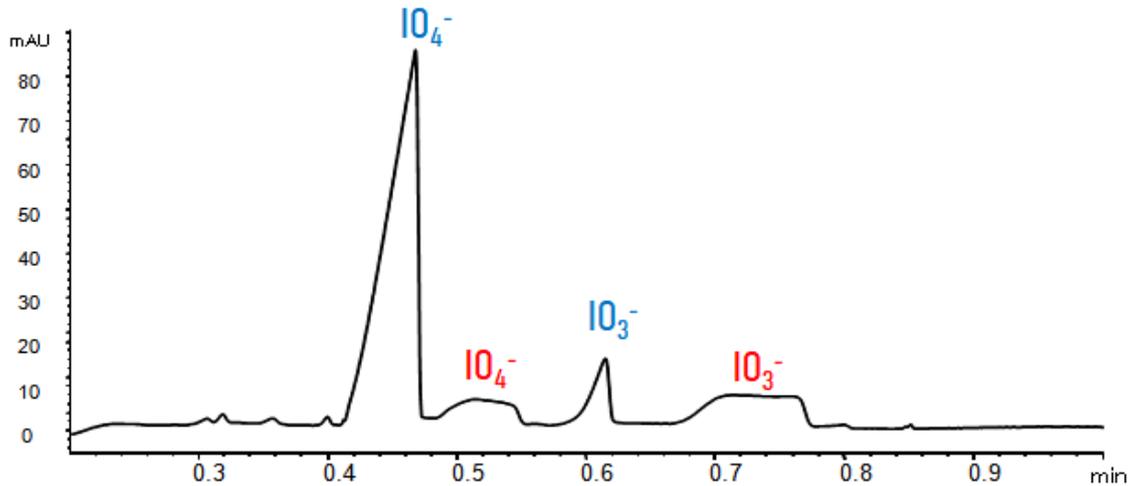
#### 4.5 ANÁLISE DE GLICERINA TOTAL

A análise da GT é mais complexa que a análise GL. A GT é a soma da glicerina livre com as formas ligadas da glicerina. Portanto, a análise de GT diretamente não é possível, porque as formas ligadas da glicerina são de baixa polaridade e insolúveis no eletrólito de corrida, além de não apresentarem carga. Portanto, o preparo da amostra da glicerina requer uma etapa de transformação da glicerina ligada em glicerina livre. Essa etapa é realizada através da adição de solução etanólica de KOH à amostra de biodiesel.

Após a conversão da glicerina ligada em livre é necessário adicionar solução ácida à amostra. Sem adição de ácido, não é possível fazer a LLE da glicerina, pois a separação de fases quando clorofórmio é adicionado não ocorre. A acidificação da amostra, no método proposto por Spudeit em 2012, era realizada com ácido acético. Porém, com a acidificação

com ácido acético, picos achatados foram obtidos, como mostra o eletroferograma da figura 17.

Figura 16: Efeito do ácido acético sobre a amostra de GT.



Legenda: Em **vermelho**, íons referentes à GT. Em **azul**, íons referentes à GL.  
Fonte: O autor.

Para que os picos apresentem o aspecto achatado, a concentração do analito deve ser praticamente equivalente em cada seção da zona de amostra de GT. A velocidade de migração dos analitos dentro da zona da amostra também deve ser igual à velocidade dos analitos na região do eletrólito de corrida. Nesse caso, não haverá nenhum processo de *stacking* dos analitos na interface entre a zona de amostra e a zona de eletrólito, como demonstrado na figura 12. Como os íons acetato estão presentes nas zonas de amostra e de eletrólito, as condutividades de ambas as zonas são similares e os analitos migram com a mesma velocidade em ambas as zonas. Portanto, para acidificação da amostra, foi utilizado HCl. Os íons  $H^+$  e  $Cl^-$  são mais rápidos que os íons acetato, e a condutividade da zona da amostra é maior que a condutividade da zona do eletrólito. Por motivos previamente discutidos na seção 4.1 e figura 12, os picos de interesse voltaram ao aspecto normal utilizando um ácido forte para a neutralização do KOH.

#### 4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO E ANÁLISE DE AMOSTRAS

A tabela 6 mostra os resultados obtidos para a validação do procedimento analítico. O valor de  $F_{\text{calculado}}$  foi obtido através da equação 13, onde  $p$  é o número de níveis de concentração da curva de calibração,  $m$  é o número total de replicatas e  $m_i$  é o número de replicatas realizadas em cada nível  $i$ . Caso  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$  a hipótese de que o modelo é linear é aceite com um determinado nível de significância ( $\alpha$ ) (DANZER; CURRIE, 1998; FARIA; SOUZA; OLIVEIRA, 2008; OLIVIERI, 2015). Todas as curvas de calibração demonstraram um modelo linear, com valores de  $r^2$  superiores a 0,998 e valores de  $F_{\text{calculado}}$  inferiores ao  $F_{\text{crítico}} = 2,4$  com  $\alpha = 0,05$ .

$$F_{\text{calculado}} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p-2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m-p)} \quad (13)$$

Os limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) de GT foram de 0,017% m/m e 0,0056% m/m. Para GL, os valores de LOQ e LOD são 10 vezes menores, pois a diluição da amostra de GL é menor, e o volume de amostra de GL introduzido na etapa de injeção é o dobro do volume injetado de amostra de GT.

Os valores calculados de precisão *interday* foram inferiores a 7,3 % de CV. Apesar das diversas etapas de injeção das amostras por ambas as extremidades do capilar, a variação instrumental do método não ultrapassou 2,1 % de CV. Os valores obtidos através da avaliação da precisão *intraday* foram inferiores a 5,0 % de CV. Os valores de CV são maiores para a GT, provavelmente porque o preparo de amostra da GT requer etapas adicionais de reação com KOH e acidificação com HCl.

A avaliação da exatidão através do teste-t mostrou que os valores obtidos pelo método desenvolvido por CZE apresentou resultados equivalentes à amostra de referência. Para todos os analitos, o valor de  $t$  calculado foi inferior ao valor de  $t$  crítico. Portanto, com um nível de confiança de 95%, não há diferença estatística entre as concentrações obtidas pelo método desenvolvido e as concentrações de referência. A exatidão também demonstra que o método tem especificidade para os analitos de interesse.

Tabela 6: Parâmetros de validação para o método desenvolvido.

Analito	Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	Equação da curva	Linearidade		LOQ <sup>b</sup>	LOD <sup>a</sup>
			R <sup>2</sup>	F calculado <sup>a</sup>		
Glicerina total	2,00 – 35,0	y = 0,054x + 0,024	0,999	0,95	0,017 % (m/m)	0,0056 % (m/m)
Glicerina livre	2,00 – 35,0	y = 0,046x + 0,018	0,999	1,11	0,0017 % (m/m)	0,00055 % (m/m)
K <sup>+</sup>	0,25 – 5,00	y = 0,418x + 0,007	0,999	1,05	0,50 mg kg <sup>-1</sup>	0,17 mg kg <sup>-1</sup>
Ca <sup>+2</sup>	0,25 – 5,00	y = 0,880x + 0,038	0,999	1,45	0,195 mg kg <sup>-1</sup>	0,065 mg kg <sup>-1</sup>
Na <sup>+</sup>	0,25 – 5,00	y = 0,869x + 0,065	0,998	1,16	0,16 mg kg <sup>-1</sup>	0,053 mg kg <sup>-1</sup>
Mg <sup>+2</sup>	0,25 – 5,00	y = 1,681x + 0,013	0,999	1,13	0,071 mg kg <sup>-1</sup>	0,023 mg kg <sup>-1</sup>

	Precisão Instrumental (% CV)	Precisão Intraday (% CV)	Precisão Interday (% CV)	Exatidão <sup>c</sup>	
				Valor calculado de t	Valor crítico de t
Glicerina total	2,1	1,8 - 5,0	2,5 - 7,3	1,45	2,160
Glicerina livre	2,0	1,0 - 3,6	2,5 - 4,2	-0,87	2,160
K <sup>+</sup>	1,5	1,4 - 3,6	1,7 - 6,2	0,253	2,201
Ca <sup>+2</sup>	1,3	0,9 - 4,3	1,1 - 4,8	0,806	2,179
Na <sup>+</sup>	0,9	2,1 - 3,5	2,5 - 4,4	-0,935	2,228
Mg <sup>+2</sup>	1,3	1,2 - 2,9	1,6 - 4,5	-1,274	2,179

<sup>a</sup> F<sub>crítico</sub> = 2,40

<sup>b</sup> LOQ e LOD foram calculados considerando que o analista realizará a extração usando 300 mg de biodiesel para os cátions, e 100 mg de biodiesel para extração da GT e GL.

<sup>c</sup> Calculado através da concentração média encontrada por n ≥ 9 laboratórios em comparação com a concentração encontrada através do método proposto. Teste-t foi aplicado com nível de confiança de 95%.

Fonte: O autor.

Uma característica interessante observada é a semelhança entre os coeficientes angulares das equações de curva de Ca<sup>+2</sup> e Na<sup>+</sup>. Como o método é indireto para análise de cátions, o fator mais importante é a capacidade de cada analito em deslocar o imidazol protonado (Im<sup>+</sup>). Em termos de carga, o Ca<sup>+2</sup> desloca duas vezes mais grupos Im<sup>+</sup> que o Na<sup>+</sup>. A massa molar do Na<sup>+</sup> é quase a metade da massa do Ca<sup>+2</sup>. Portanto, se as concentrações de Ca<sup>+2</sup> e Na<sup>+</sup> são iguais em mg L<sup>-1</sup>, em mol L<sup>-1</sup>, a concentração do Na<sup>+</sup> é o dobro do Ca<sup>+2</sup>. Assim, o Na<sup>+</sup> desloca a mesma quantidade de íons Im<sup>+</sup> que o Ca<sup>+2</sup> que, apesar de ter carga duas vezes maior, está com metade da concentração molar do Na<sup>+</sup>. Logo, quando concentrações equivalentes, em mg L<sup>-1</sup>, de Ca<sup>+2</sup> e Na<sup>+</sup> são injetados, os valores das áreas obtidas para os dois analitos é semelhante. Assim, os coeficientes angulares observados para as curvas de calibração são praticamente iguais.

O desempenho interlaboratorial do método foi avaliado através dos valores de Z-score obtidos para cada laboratório (tabela 7). O Z-score foi calculado através da equação 14,

onde  $x_{\text{lab}}$  é o resultado encontrado por determinado laboratório,  $\bar{x}_L$  é a média de todos os resultados e  $\delta$  é o desvio padrão dos resultados (HOLLANDS *et al.*, 2017; ISAO; KAZUTOSHI, 2014). Para o ensaio,  $\bar{x}_L$  foi considerado como a média robusta dos laboratórios participantes e  $\delta$  como o desvio padrão robusto dos resultados. Ambos os valores foram calculados através do algoritmo A, encontrado no apêndice C da ISO 13528:2015. (E)(ISO, 2015).

$$Z - score = \frac{x_{\text{lab}} - \bar{x}_L}{\delta} \quad (14)$$

Para esse teste de desempenho interlaboratorial, os resultados do *Z-score* indicam quão afastado está cada laboratório em relação à média robusta em termos de desvio padrão robusto. Ou seja, um *Z-score* = 1 significa que o laboratório obteve uma média que está a um desvio padrão robusto de diferença da média robusta. Portanto, é possível avaliar quão próximos estão entre si os resultados encontrados pelos laboratórios. O desempenho interlaboratorial do método é considerado satisfatório quando  $|Z - score| \leq 2$ , questionável se  $2 < |Z - score| < 3$  e insatisfatório se  $|Z| \geq 3$  (HOLLANDS *et al.*, 2017; ISAO; KAZUTOSHI, 2014).

Os ensaios interlaboratoriais foram realizados em quatro laboratórios que foram selecionados de acordo com a localização, disponibilidade de equipamentos e disponibilidade de analistas com alguma experiência em CE para realizar as análises. De acordo com esse modelo avaliação dos resultados, o desempenho interlaboratorial do método foi satisfatório, pois todos os valores de *Z-score* calculados estão entre  $\pm 2$ . Valores de média robusta e desvio padrão robusto também estão representados na tabela 7. Como são poucos laboratórios participantes, a média e desvio padrão são próximos aos valores robustos.

A tabela 8 mostra os valores de concentrações calculadas dos analitos na amostra interlaboratorial e em cada laboratório. Os analistas receberam procedimentos operacionais para aplicação do método, mas não receberam treinamento prévio. De acordo com o teste-t, a média dos resultados obtidos por eletroforese é equivalente aos valores de referência (amostra interlaboratorial) com um nível de confiança de 95%, pois o valor p é superior a 0,05.

Tabela 7: Valores de *Z-score* obtidos utilizando o método proposto em quatro laboratórios.

Laboratório	<i>Z-score</i> <sup>a</sup>					
	GT	GL	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>
Química UFSC	- 0,31	1,29	- 0,59	- 0,89	- 0,78	1,16
MAPA Florianópolis	- 1,08	0,29	1,23	1,06	1,38	- 0,64
EPAGRI Itajaí	1,00	1,14	- 0,69	0,37	- 0,23	- 0,76
Farmácia UFSC	0,38	- 0,57	0,07	- 0,53	- 0,37	0,32
Média robusta	0,187 (% m/m)	0,0057 (% m/m)	1,6 (mg Kg <sup>-1</sup> )	3,1 (mg Kg <sup>-1</sup> )	4,3 (mg Kg <sup>-1</sup> )	4,2 (mg Kg <sup>-1</sup> )
Desvio padrão robusto	0,013 (% m/m)	0,0008 (% m/m)	0,2 (mg Kg <sup>-1</sup> )	0,2 (mg Kg <sup>-1</sup> )	0,3 (mg Kg <sup>-1</sup> )	0,3 (mg Kg <sup>-1</sup> )

<sup>a</sup> Amostra de referência para o *Z-score* foi a amostra interlaboratorial.

Fonte: O autor.

Tabela 8: Valores de concentração e precisão interlaboratorial obtidos através do método proposto.

	<b>Concentração</b>					
	GT (% m/m)	GL (% m/m)	K <sup>+</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	Ca <sup>+2</sup> (mg Kg <sup>-1</sup> )	Na <sup>+</sup> (mg Kg <sup>-1</sup> )	Mg <sup>+2</sup> (mg Kg <sup>-1</sup> )
Analista A <sup>a</sup>	0,183 ± 0,01	0,0066 ± 0,0002	1,47 ± 0,03	2,92 ± 0,01	4,04 ± 0,04	4,51 ± 0,04
Analista B <sup>b</sup>	0,173 ± 0,01	0,0059 ± 0,0002	1,8 ± 0,2	3,4 ± 0,5	4,79 ± 0,08	4,1 ± 0,3
Analista C <sup>c</sup>	0,200 ± 0,01	0,0049 ± 0,0004	1,4 ± 0,2	3,2 ± 0,9	4,2 ± 0,6	3,9 ± 0,1
Analista D <sup>d</sup>	0,192 ± 0,01	0,0057 ± 0,002	1,6 ± 0,2	2,9 ± 0,3	4,18 ± 0,09	4,3 ± 0,1
Média Eletroforese	0,187 ± 0,01	0,0057 ± 0,0008	1,6 ± 0,2	3,2 ± 0,2	4,3 ± 0,3	4,2 ± 0,2
Média (Referência)	0,188 ± 0,01	0,0060 ± 0,001	1,5 ± 0,5	3,0 ± 0,4	3,9 ± 0,4	4,2 ± 0,5
Valor p	0,87	0,58	0,65	0,36	0,09	0,98
Precisão interlaboratorial (% CV)	6,2	12,1	10,2	6,5	6,9	4,9
Desvio predito <sup>e</sup> (% CV)	10,1	13,5	14,9	13,5	12,8	12,9
<i>HorRat</i>	0,6	0,9	0,7	0,4	0,5	0,4

<sup>a</sup> Equipamento usado rotineiramente. Experiência do analista com CE: superior a 6 anos. Local: Departamento de Química da UFSC.

<sup>b</sup> Equipamento usado regularmente. Experiência do analista com CE: entre 4 a 5 anos. Local: MAPA de Florianópolis.

<sup>c</sup> Equipamento raramente usado (1 ano inoperante). Experiência do analista com CE: entre 3 a 4 anos. Local: EPAGRI de Itajaí.

<sup>d</sup> Equipamento raramente utilizado. Experiência do analista com CE: inferior a 2 anos. Local: Departamento de farmácia da UFSC.

<sup>e</sup> Desvio predito pela equação de *Horwitz*. Considera-se que, após o preparo de amostra, as concentrações de glicerina para GT e GL serão aproximadamente 21 e 3,5 mg L<sup>-1</sup>.

Fonte: O autor.

As equações de *Horwitz* e *HorRat* (Razão *Horwitz*) foram utilizadas para avaliar a reprodutibilidade do método. Na equação 15,  $CV_{prev.Reprod.}$  é o coeficiente de variação previsto para análises de um determinado analito que está em uma determinada concentração  $c_A$  (em fração mássica). Na equação 16, o *HorRat* é a razão entre o  $CV_{prev.Reprod.}$  e o coeficiente de variação experimental ( $CV_{exp}$ ). Valores de *HorRat* entre 0,5 e 2,0 são considerados aceitáveis (ANILANMERT *et al.*, 2016; AOAC INTERNATIONAL, 2016).

$$CV_{prev.Reprod.} = 2^{(1-0,5 \log c_A)} \quad (15)$$

$$HorRat = \frac{CV_{exp}}{CV_{prev}} \quad (16)$$

Em relação à reprodutibilidade, avaliada através da precisão interlaboratorial do método, valores de CV (%) inferiores aos valores previstos pela equação de *Horwitz* foram obtidos, pois todos os valores de *HorRat* calculados para os diferentes analitos estão na faixa entre 0,4 - 0,9 (tabela 8). Portanto o método apresentou reprodutibilidade aceitável, com melhores resultados para o  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$ , que apresentaram os menores desvios entre os laboratórios.

A tabela 9 descreve os valores de CV e *HorRat* para avaliação da precisão *intraday* (repetibilidade) de quatro analistas diferentes para a análise da amostra interlaboratorial. A equação 17 foi utilizada para obter os valores de coeficiente de variação previstos para a repetibilidade ( $CV_{prev.Repet.}$ ). A faixa de *HorRat* aceita também é diferente em relação a reprodutibilidade, que é alterada para 0,3 - 1,3 (AOAC INTERNATIONAL, 2016; RAO, 2018).

$$CV_{prev.Repet.} = 0,67 \cdot CV_{prev.Reprod.} \quad (17)$$

Ao avaliar a repetibilidade do método para analistas diferentes (tabela 9), observa-se que os valores de CV são bastante diferentes para cada analista. Em relação à GT e GL foram obtidos valores inferiores a 8,6 % de CV, com exceção do analista D, que obteve quase 40 %

de CV e *HorRat* de 4,5. Porém essa variação deve ser proveniente do preparo de amostra de GL realizado pelo próprio analista.

Para os cátions, os melhores valores de CV e *HorRat* foram obtidos para o  $Mg^{+2}$ , onde os valores de CV não ultrapassaram 7 % e os valores de *HorRat* foram inferiores a 0,8. Em relação ao  $Na^{+}$ , apenas o analista C obteve *HorRat* > 1,3 cujo resultado pode ser indicativo de contaminação de  $Na^{+}$  durante as análises. Em relação ao  $Ca^{+2}$ , dois analistas obtiveram *HorRat* > 1,3 sendo o que o maior valor obtido foi de 3,1 pelo analista C. O erro proveniente das análises do analista C pode ter ocorrido na etapa de agitação da amostra por tempo e com intensidade insuficiente, ou na etapa de centrifugação para separação das fases, onde gotículas de fase orgânica ainda poderiam estar presentes na fase aquosa que foi injetada. O laboratório onde o analista C fez as análises não estava equipado com agitadores vortex e centrifugas de tubos *Eppendorf* como os outros. Para análise de  $K^{+}$ , apenas um valor de *HorHat* foi superior a 1,3, porém encontra-se apenas 0,1 acima do limite superior.

Considerando que os analistas não obtiveram treinamento algum em relação ao método e que utilizaram equipamentos cuja manutenção é desconhecida, os resultados de reprodutibilidade e repetibilidade foram satisfatórios, pois valores de *HorRat* superiores as faixas consideradas aceitas foram casos pontuais. Alguns valores de *HorRat* foram inferiores ao aceito. Porém, isso apenas indica que a variação experimental foi menor do que a prevista.

Tabela 9: Valores de CV e *HorRat* para avaliar a repetibilidade de cada analista.

		GT <sup>a</sup>	GL <sup>a</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>
Analista A <sup>b</sup>	CV (%)	4,7	3,3	2,0	0,3	0,9	0,8
	<i>HorRat</i>	0,7	0,4	0,1	0,02	0,1	0,1
Analista B <sup>c</sup>	CV (%)	8,1	2,9	13,8	14,3	1,7	7
	<i>HorRat</i>	1,2	0,3	1,4	1,6	0,2	0,8
Analista C <sup>d</sup>	CV (%)	4,9	8,6	13,7	27,5	14,4	3,2
	<i>HorRat</i>	0,7	0,9	1,3	3,1	1,7	0,4
Analista D <sup>e</sup>	CV (%)	7,2	39,6	11,2	2,5	2,1	3
	<i>HorRat</i>	1,1	4,5	1,1	0,3	0,2	0,3

<sup>a</sup> Considera-se que, após o preparo de amostra, as concentrações de GT e GL na amostra interlaboratorial são aproximadamente 21 e 3,5 mg L<sup>-1</sup> respectivamente.

<sup>b</sup> Equipamento usado rotineiramente. Experiência do analista com CE: superior a 6 anos. Local: Departamento de Química da UFSC.

<sup>c</sup> Equipamento usado regularmente. Experiência do analista com CE: entre 4 a 5 anos. Local: MAPA de Florianópolis.

<sup>d</sup> Equipamento raramente usado (1 ano inoperante). Experiência do analista com CE: entre 3 a 4 anos. Local: EPAGRI de Itajaí.

<sup>e</sup> Equipamento raramente utilizado. Experiência do analista com CE: inferior a 2 anos. Local: Departamento de farmácia da UFSC.

Fonte: O autor.

Em relação às análises das amostras no laboratório de Química da UFSC, a tabela 10 mostra as concentrações obtidas para os cátions, GT e GL em quatro amostras diferentes. Para a amostra interlaboratorial, os parâmetros de qualidade Na + K e Ca + Mg ultrapassam os valores estipulados pela RANP-45 de 5 mg Kg<sup>-1</sup>. A amostra ABL apresentou baixa concentração de Na<sup>+</sup>, e ambas as amostras B1 e B2 apresentaram Na<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup>, mas as amostras não ultrapassaram o limite da ANP. Com exceção da amostra Interlaboratorial, todas as amostras apresentaram concentração de K<sup>+</sup> e Mg<sup>+2</sup> abaixo do LOQ. Todas as amostras, com exceção da amostra B2, apresentaram concentrações de GT abaixo do limite estipulado pela RANP-45 de 0,25 % (m/m). Nenhuma amostra testada ultrapassou o limite estipulado de 0,02 % (m/m) para GL.

Tabela 10: Concentração de cátions, GT e GL encontrados em amostras utilizando o método proposto.

Amostra	K <sup>+</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	Na <sup>+</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	Ca <sup>+2</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	Mg <sup>+2</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	GT (% m/m)	GL (% m/m)
Interlaboratorial	1,47 ± 0,03	4,04 ± 0,03	2,92 ± 0,01	4,51 ± 0,04	0,182 ± 0,004	0,0067 ± 0,0002
Valores de Referência <sup>a</sup>	1,5 ± 0,5	3,89 ± 0,4	3,0 ± 0,4	4,2 ± 0,5	0,188 ± 0,01	0,0060 ± 0,001
Amostra ABL	< LOQ	0,73 ± 0,02	< LOQ	< LOQ	0,200 ± 0,007	0,010 ± 0,0005
Valores de Referência <sup>b</sup>	N/I	N/I	N/I	N/I	0,182 ± 0,025	0,011 ± 0,003
B1	< LOQ	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,1	< LOQ	0,218 ± 0,02	< LOQ
B2	< LOQ	0,43 ± 0,08	0,19 ± 0,02	< LOQ	0,295 ± 0,01	0,0056 ± 0,001

<sup>a</sup> Calculado através de resultados encontrados por n ≥ 9 laboratórios. Os métodos oficiais utilizados foram DIN EN14538, NBR 15553, NBR 15556, NBR 15908, ASTM D 6584 e NBR 15908. Referente à amostra interlaboratorial.

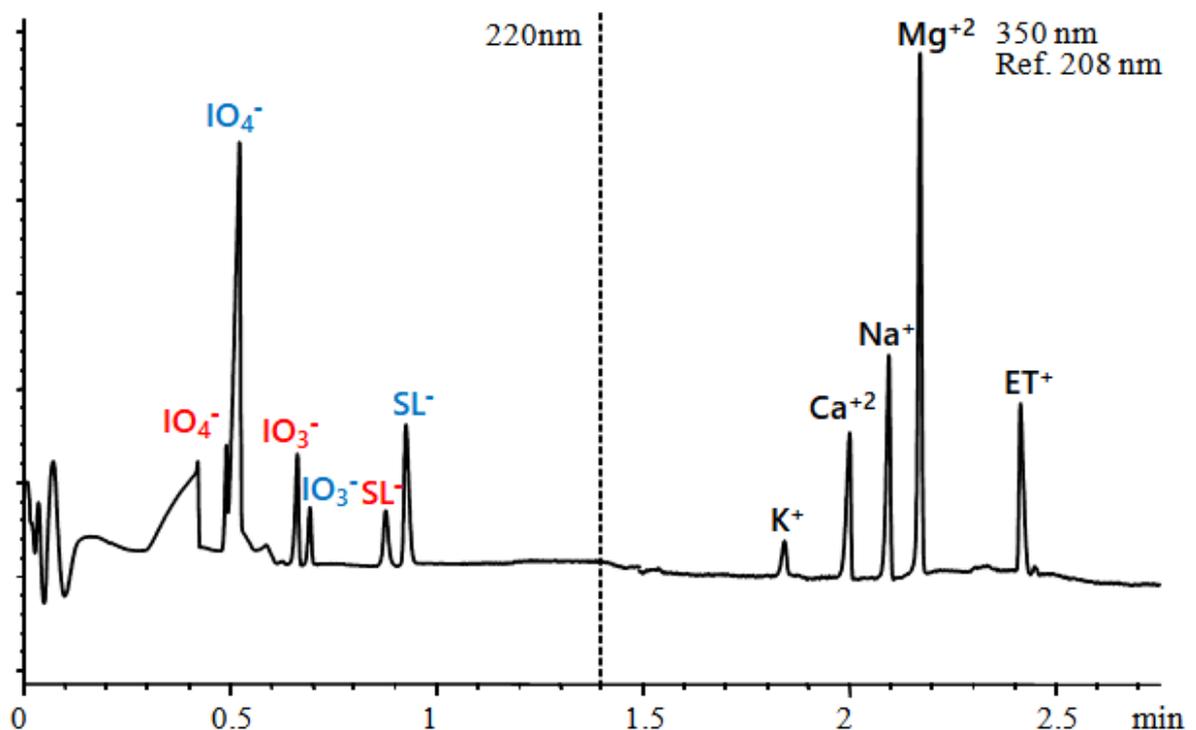
<sup>b</sup> A norma ASTM D 6584 foi utilizada para calcular a concentração da amostra ABL. O termo N/I indica que o valor de referência não foi informado.

Fonte: O autor.

A figura 18 representa o eletroferograma obtido para análise da amostra interlaboratorial com o método proposto. Como pode ser observado, picos estreitos foram obtidos e com resolução satisfatória. Observando o eletroferograma, também é possível notar

por que o padrão interno para os ânions foi o  $SL^-$ . Se o padrão interno fosse  $NO_3^-$ , por exemplo, haveria comigração do padrão interno com o primeiro pico do eletroferograma, que provavelmente é referente ao íon  $Cl^-$  da GT. Porém, o íon  $SL^-$  migra em um tempo onde não há interferências próximas. Em relação aos Cátions, se o padrão interno fosse  $Ba^{+2}$ , haveria comigração do  $Ba^{+2}$  com o  $K^+$ . Porém, a etanolamina ( $ET^+$ ) migra em um tempo superior aos outros cátions, e não há riscos da etanolamina precipitar por variações de pH.

Figura 17: Eletroferograma da análise da amostra interlaboratorial com o método proposto.



Legenda: Em **vermelho**, íons referentes à GT. Em **azul**, íons referentes à GL.

$SL^-$  – salicilato;  $ET^+$  – etanolamina protonada.

Fonte: O autor.

#### 4.7 MÉTODO PARA TRANSFORMAÇÃO DOS ELETROFEROGRAMAS EM MOBILIDADES EFETIVAS

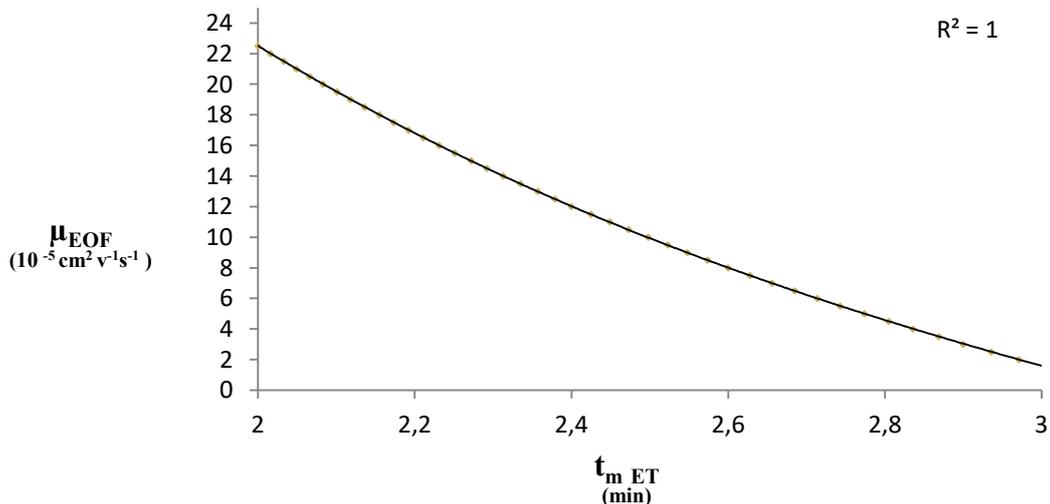
Em métodos desenvolvidos por CE, os tempos de migração ( $t_m$ ) dos analitos podem ser irreprodutíveis devido a existência do EOF, que varia entre as corridas principalmente devido a variações de pH e ionização da superfície do capilar. Quando a velocidade do fluxo eletrosmótico é alta, é possível observá-lo no eletroferograma. Porém, no método proposto,

onde o eletrólito tem pH ácido, a velocidade do EOF não é muito alta e não pode ser observado dentro do tempo de geração do eletroferograma. Conhecer a mobilidade do fluxo eletrosmótico ( $\mu_{\text{EOF}}$ ) é importante porque, embora o  $t_m$  do analito sofra alterações, a  $\mu_{\text{eff}}$  do analito entre as corridas não deve sofrer alterações significativas. Portanto, ao calcular o valor de  $\mu_{\text{EOF}}$ , é possível também calcular a  $\mu_{\text{eff}}$  do analito de interesse.

Para calcular a  $\mu_{\text{EOF}}$ , foi utilizado como referência o tempo de migração simulado da etanolamina ( $t_{m \text{ ET}}$ ). A etanolamina foi escolhida por ser o padrão interno da análise de cátions e, portanto, sempre estará presente no eletroferograma das amostras. A figura 19 representa a curva obtida e representa os valores de  $t_{m \text{ ET}}$  obtidos para cada valor de  $\mu_{\text{EOF}}$  escolhido entre a faixa de 0 a 22 ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). A equação 18 representa a equação da curva obtida. Ao realizar esse procedimento, é possível calcular o valor de  $\mu_{\text{EOF}}$  experimental usando os valores experimentais de  $t_{m \text{ ET}}$ , na equação 18.

$$\mu_{\text{EOF}} = -3,3777t_{m \text{ ET}}^3 + 33,789t_{m \text{ ET}}^2 - 125,65t_{m \text{ ET}} + 165,72 \quad (18)$$

Figura 18: Curva de mobilidade efetiva do fluxo ( $\mu_{\text{EOF}}$ ) vs tempo de migração da etanolamina ( $t_{m \text{ ET}}$ ).



Fonte: O autor.

Como representado na tabela 11, utilizando o  $t_{m \text{ ET}}$  para cálculo de  $\mu_{\text{EOF}}$  em eletroferogramas obtidos em quatro laboratórios diferentes, obteve-se valores de  $\mu_{\text{EOF}}$  entre

8,9 e 11,69 ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). A variação do fluxo entre os laboratórios pode atingir até 37 %. Porém, como o valor de  $\mu_{\text{EOF}}$  ainda é relativamente baixo, a variação no tempo de migração dos analitos não atinge esse valor. A comparação entre os coeficientes de variação de tempo de migração e mobilidade efetiva dos analitos estão representados na tabela 12. Os valores de CV que, por tempo de migração atingiram até 8,4 %, foram reduzidos para menos de 1% observados em termos de mobilidade efetiva dos analitos.

Em relação à tabela 12, valores de  $\mu_{\text{eff}}$  para os ânions da GL e cátions são mais similares aos valores reais de mobilidade do que os valores obtidos para os ânions de GT, pois, no capilar, a amostra de GT está mais próxima à janela de detecção que a amostra de GL.

Tabela 11: Valores de mobilidade do fluxo eletrosmótico calculados a partir do tempo de migração da etanolamina ( $T_{\text{m ET}}$ ).

Laboratório	$t_{\text{m ET}}$ (min)	$\mu_{\text{EOF}}^{\text{a}}$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$\mu_{\text{EOF}}^{\text{b}}$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
Química UFSC	2,42	11,69	11,70
MAPA Florianópolis	2,63	7,38	7,40
EPAGRI Itajaí	2,60	8,00	8,04
Farmácia UFSC	2,55	8,90	8,91

<sup>a</sup> Calculado via tentativa e erro através do *software Peakmaster 5.3*, alterando aleatoriamente o valor da mobilidade do fluxo eletrosmótico até que o tempo de migração simulado e experimental fossem equivalentes.

<sup>b</sup> Calculado utilizando o tempo de migração experimental da etanolamina na equação 18.

Tabela 12: Tempos de migração e mobilidades efetivas dos analitos.

Analito	Tempo de migração médio (min)	CV (%)	Mobilidade efetiva média ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	CV (%)
$\text{IO}_3^-$	0,68	5,79	- 45,49	0,34
$\text{IO}_3^-$	0,71	5,61	- 43,51	0,37
$\text{SL}^-$	0,90	8,43	- 36,58	0,88
$\text{SL}^-$	0,96	8,16	- 34,84	0,49
$\text{K}^+$	1,95	2,67	+ 55,50	0,44
$\text{Ca}^{+2}$	2,11	3,05	+ 50,52	0,15
$\text{Na}^+$	2,22	3,18	+ 47,75	0,17
$\text{Mg}^{+2}$	2,29	3,34	+ 45,88	0,08
$\text{ET}^+$	2,55	3,75	+ 45,49	0,34

Legenda: Em **vermelho**, íons referentes à GT. Em **azul**, íons referentes à GL.

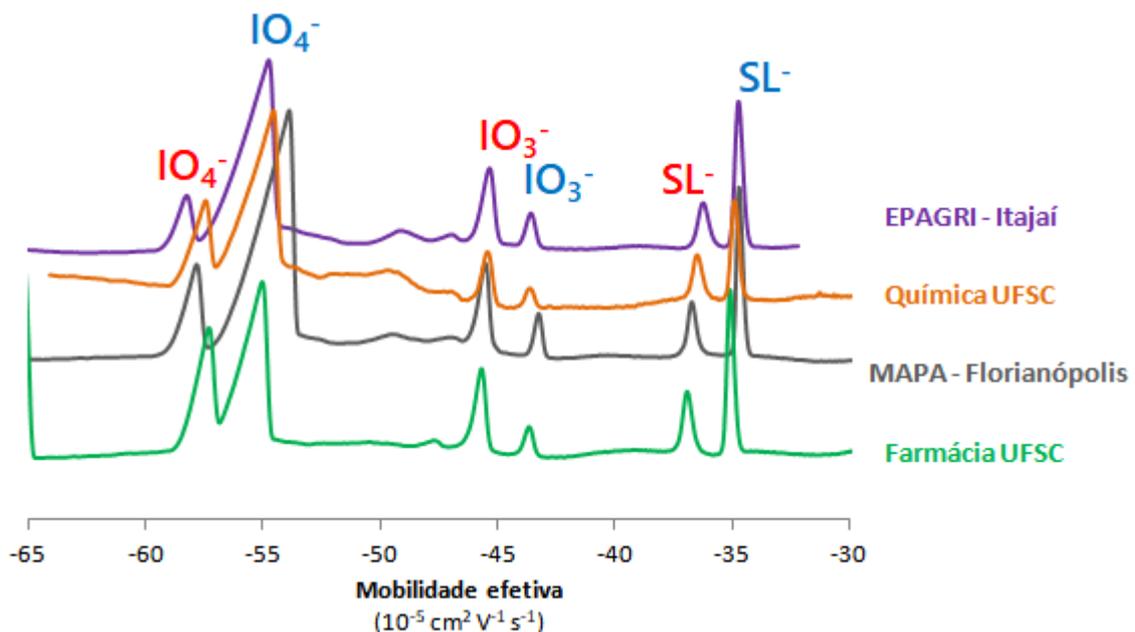
$\text{SL}^-$  – salicilato;  $\text{ET}^+$  – etanolamina protonada.

Fonte: O autor.

Os eletroferogramas referentes a análise da amostra interlaboratorial em quatro laboratórios diferentes estão representados nas figuras 20 e 21. Observa-se um alinhamento efetivo entre os picos dos analitos, mesmo com valores de  $\mu_{\text{EOF}}$  diferentes para cada laboratório.

A transformação do eixo de tempo de migração para mobilidade efetiva é importante principalmente para auxiliar na identificação dos picos. Como os cátions não absorvem no UV, não é possível utilizar um espectro para identificação do cátion e, portanto, calcular a  $\mu_{\text{eff}}$  pode ser uma opção mais simples que realizar uma adição de padrão para identificação do pico. Para GT e GL a identificação dos picos também pode ser comprometida. Devido à proximidade entre os picos de  $\text{IO}_3^-$  da GT e GL, a identificação pode ser relativamente difícil caso um dos parâmetros esteja abaixo do LOD. Haveria a dúvida referente à qual parâmetro o íon  $\text{IO}_3^-$  está relacionado, se a GT ou se a GL. Porém, calculando-se o valor de  $\mu_{\text{EOF}}$  para calcular a  $\mu_{\text{eff}}$  dos analitos, a variação torna-se muito baixa e a identificação dos picos é simplificada.

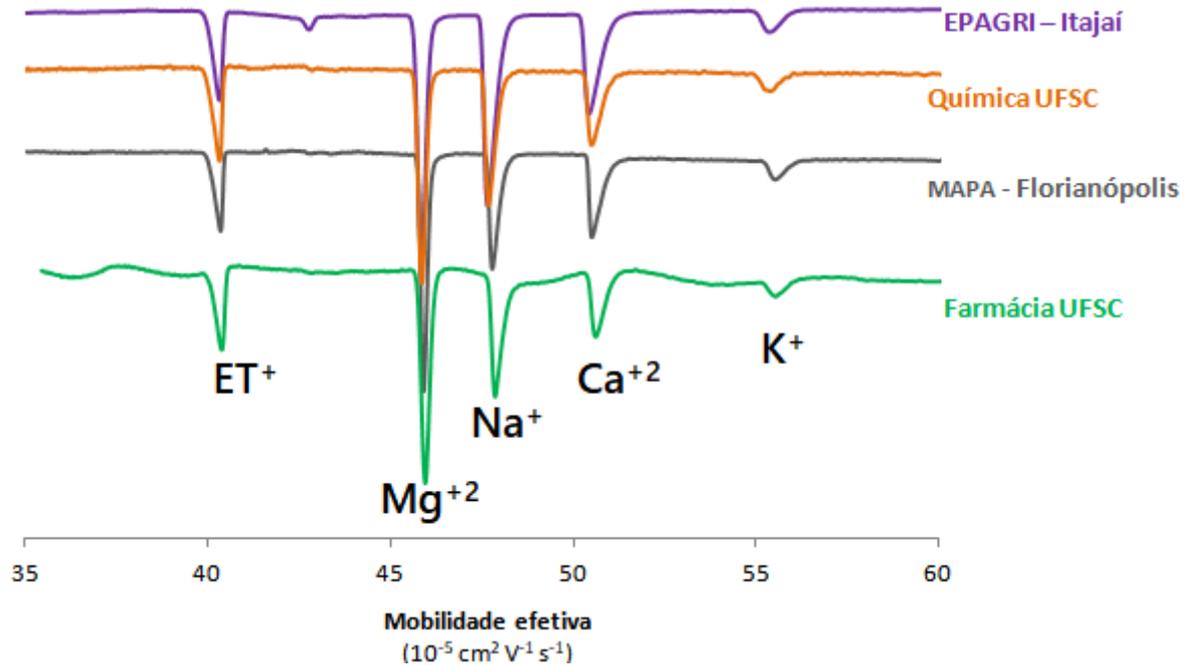
Figura 19: Eletroferogramas cujos eixos de tempo foram modificados para mobilidade efetiva. Seção referente às análises de GT e GL.



Legenda: Em **vermelho**, íons referentes à GT. Em **azul**, íons referentes à GL.  
 $\text{SL}^-$  — salicilato

Fonte: O autor.

Figura 20: Eletroferogramas cujos eixos de tempo foram modificados para mobilidade efetiva. Seção referente às análises de cátions.



Legenda: ET<sup>+</sup> – etanolamina protonada.

Fonte: O autor.

#### 4.8 MÉTODO SEM CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> E Mg<sup>+2</sup>

A primeira etapa para cálculo das concentrações de cátions é a determinação de  $\mu_{\text{EOF}}$  através do tempo de migração da etanolamina ( $t_{\text{m ET}}$ ). A tabela 13 representa os valores médios de  $t_{\text{m ET}}$  e o  $\mu_{\text{EOF}}$  obtido em diferentes laboratórios para as análises da amostra interlaboratorial. Valores de  $\mu_{\text{EOF}}$  foram calculados através da equação 18.

Tabela 13: Valores de fluxo eletrosmótico ( $\mu_{\text{EOF}}$ ) calculados através da equação 18.

Laboratório	$t_{\text{m ET}}$ (s)	$\mu_{\text{EOF}}$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
EPAGRI – Itajaí	146,5 ± 1,6	11,2 ± 0,6
Química UFSC	145,7 ± 2,1	11,4 ± 0,7
MAPA – Florianópolis	157,8 ± 0,3	7,5 ± 0,1
Farmácia UFSC	155,7 ± 2,8	8,1 ± 0,9

Fonte: O autor.

Os valores de  $\mu_{\text{eff CO}}$  e  $\mu_{\text{eff CT}}$  calculados através do programa *Peakmaster 5.3* foram +47,8 e - 9,57 ( $10^5 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), respectivamente. A tabela 14 mostra valores de mobilidades efetivas calculadas para os cátions através das equações 5 e 6.

Tabela 14: Valores médios de mobilidade efetiva dos analitos ( $\mu_{\text{eff A}}$ ).

Laboratório	$\mu_{\text{eff A}}^a$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )				
	$\text{K}^+$	$\text{Ca}^{+2}$	$\text{Na}^+$	$\text{Mg}^{+2}$	$\text{ET}^+$
EPAGRI – Itajaí	55,34	50,41	47,69	45,85	40,32
Química UFSC	55,90	50,87	48,96	46,66	40,32
MAPA – Florianópolis	55,54	50,55	47,78	45,91	40,30
Farmácia UFSC	55,60	50,48	47,76	44,58	40,31

<sup>a</sup> Valores de desvio padrão ocultados por serem ínfimos.

Fonte: O autor.

Os resultados calculados de razão de transferência estão representados na tabela 15. Os valores obtidos são semelhantes, em módulo, aos valores das próprias cargas dos analitos. O resultado é coerente, pois a razão de transferência indica quantos moles de  $\text{Im}^+$  são deslocados por um mol de analito.

Tabela 15: Valores médios de razão de transferência ( $TR_{\text{A:CO}}$ ).

Laboratório	$TR_{\text{A:CO}}^a$				
	$\text{K}^+$	$\text{Ca}^{+2}$	$\text{Na}^+$	$\text{Mg}^{+2}$	$\text{ET}^+$
EPAGRI – Itajaí	-1,036	-2,029	-1,001	-1,982	-0,955
Química UFSC	-1,038	-2,033	-1,003	-1,984	-0,955
MAPA – Florianópolis	-1,036	-2,030	-1,001	-1,982	-0,955
Farmácia UFSC	-1,036	-2,029	-1,001	-1,958	-0,955

<sup>a</sup> Valores de desvio padrão ocultados por serem muito ínfimos.

Fonte: O autor.

Para cálculo das concentrações dos analitos na amostra interlaboratorial, foram utilizados os valores de tempo de migração experimental e corrigido e as áreas dos picos de cada analito. O tempo de migração corrigido é o tempo estimado de migração do analito supondo que não há fluxo eletrosmótico, ou seja, quando  $\mu_{\text{ap A}} = \mu_{\text{eff A}}$ . Os valores de tempo de

migração corrigidos são bastante precisos, variando apenas entre  $\pm 1$  para a maioria dos analitos. Como demonstrado na tabela 16, os valores de mobilidades efetivas não variam muito entre os laboratórios. Portanto, o tempo de migração corrigido também não varia significativamente.

Tabela 16: Tempos de migração experimentais e corrigidos para os analitos e áreas dos picos.

Laboratório	Tempo de migração experimental (s)				
	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>	ET <sup>+</sup>
EPAGRI – Itajaí	113 ± 1	122 ± 1	128 ± 1	132 ± 1	146,5 ± 1,6
Química UFSC	112 ± 1	120 ± 1	125 ± 3	130 ± 2	146 ± 2
MAPA – Florianópolis	119,8 ± 0,2	130,1 ± 0,2	136,6 ± 0,2	141,4 ± 0,2	157,9 ± 0,2
Farmácia UFSC	118 ± 3	128 ± 2	134 ± 2	139 ± 2	155 ± 3
Laboratório	Tempo de migração corrigido (s) <sup>a</sup>				
	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>	ET <sup>+</sup>
EPAGRI – Itajaí	136	149	158	164	187
Química UFSC	135	148	157	163	187
MAPA – Florianópolis	136	149	156	164	187
Farmácia UFSC	135	149	157	167	187
Laboratório	Área do pico (mAu) <sup>b</sup>				
	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>	ET <sup>+</sup>
EPAGRI – Itajaí	2,65 ± 0,06	12 ± 2,	16,3 ± 1,5	21,6 ± 0,7	10,9 ± 0,1
Química UFSC	1,62 ± 0,03	7,2 ± 0,3	10,4 ± 0,1	19,2 ± 0,4	9,6 ± 0,1
MAPA – Florianópolis	2,0 ± 0,5	8 ± 2	12 ± 1	19 ± 1	9 ± 1
Farmácia UFSC	2,7 ± 0,6	11 ± 1	14,2 ± 0,2	23 ± 1	11 ± 1

<sup>a</sup> Tempo de migração caso não houvesse fluxo eletrosmótico. Desvios padrão dos tempos são inferiores a 0,1 s.

<sup>b</sup> Áreas sofrem variações que dependem da massa de biodiesel de pesado durante o preparo da amostra.

Fonte: O autor.

A tabela 17 representa os resultados de concentração de cátions da amostra interlaboratorial calculada através da equação 12. A comparação entre os valores de referência (amostra interlaboratorial) e os valores obtidos através do método proposto está representada na tabela 19. A comparação foi realizada através do teste-t para comparação das médias com desvios padrão conhecidos.

Tabela 17: Concentração de cátions encontrados na amostra de referência através do método sem calibração.

Laboratório	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )			
	Calculada utilizando o tempo de migração experimental			
	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>
EPAGRI – Itajaí	1,62 ± 0,04	3,3 ± 0,6	5,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
Química UFSC	1,4 ± 0,2	2,4 ± 0,2	4,3 ± 0,3	3,7 ± 0,2
MAPA – Florianópolis	1,4 ± 0,2	2,6 ± 0,6	4,1 ± 0,4	3,4 ± 0,2 <sup>a</sup>
Farmácia UFSC	1,53 ± 0,21	2,8 ± 0,06	4,3 ± 0,4	3,4 ± 0,3 <sup>a</sup>
Laboratório	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )			
	Calculada utilizando o tempo de migração corrigido			
	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>
EPAGRI – Itajaí	1,71 ± 0,04	3,4 ± 0,6	5,40 ± 0,50 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,1
Química UFSC	1,2 ± 0,1	2,7 ± 0,5	4,12 ± 0,4	3,7 ± 0,2
MAPA – Florianópolis	1,5 ± 0,2	2,7 ± 0,7	4,2 ± 0,5	3,4 ± 0,2 <sup>a</sup>
Farmácia UFSC	1,6 ± 0,2	2,92 ± 0,06	4,4 ± 0,4	3,5 ± 0,3
Valor de referência <sup>b</sup>	1,5 ± 0,5	3,0 ± 0,4	3,9 ± 0,4	4,2 ± 0,5

<sup>a</sup> Valores que, de acordo com o teste t, não são equivalentes ao valor de referência (amostra interlaboratorial) com um nível de confiança de 95% (ver tabela 19).

<sup>b</sup> Calculado através de resultados encontrados por n ≥ 9 laboratórios. Os métodos oficiais utilizados foram DIN EN14538, NBR 15553, NBR 15556, NBR 15908, ASTM D 6584 e NBR 15908.

Fonte: O autor.

Através das tabelas 17 e 18, observa-se que as todas as concentrações de K<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup> são equivalentes ao valor de referência de acordo com o teste-t com um nível de confiança de 95%, independentemente da correção do t<sub>m</sub>. Em relação ao Na<sup>+</sup>, apenas um valor é considerado diferente da amostra de referência. Para o Mg<sup>+2</sup>, quando não há correção do t<sub>m</sub>, três laboratórios encontraram valores que não são equivalentes ao valor de referência. Porém, ao utilizar o t<sub>m</sub> corrigido, onde é considerado que não há fluxo eletrosmótico, os valores obtidos de Mg<sup>+2</sup> para a amostra foram considerados equivalentes através do teste t.

Tabela 18: Comparação através do teste t entre valores obtidos e valores de referência.

Laboratório	Valor p <sup>a</sup>			
	Comparação entre referência e valor de			
	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>
EPAGRI – Itajaí	0,79	0,11	0,0002 <sup>c</sup>	0,04 <sup>c</sup>
Química UFSC	0,6	0,09	0,12	0,15
MAPA – Florianópolis	0,12	0,4	0,41	0,02 <sup>c</sup>
Farmácia UFSC	0,97	1	0,14	0,03 <sup>c</sup>

Laboratório	Valor p <sup>b</sup>			
	Calculada utilizando o tempo de migração corrigido			
	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>
EPAGRI – Itajaí	0,57	0,12	< 0,00001 <sup>c</sup>	0,08
Química UFSC	0,34	0,26	0,35	0,15
MAPA – Florianópolis	0,84	0,29	0,3	0,02 <sup>c</sup>
Farmácia UFSC	0,87	0,8	0,06	0,4

<sup>a</sup> Valore p obtido através da comparação entre o valor de referência (amostra interlaboratorial) e o valor obtido com o método sem calibração utilizando o tempo de migração experimental.

<sup>b</sup> Valore p obtido através da comparação entre o valor de referência (amostra interlaboratorial) e o valor obtido com o método sem calibração utilizando o tempo de corrigido.

<sup>c</sup> Valores de p < 0,05 indicam que o valor não é estatisticamente equivalente ao valor de referência com um nível de confiança de 95%

Fonte: O autor.

O método sem calibração apresentou resultados satisfatórios. É importante ressaltar que o método sem calibração é realizado em um procedimento onde existem injeções múltiplas em ambas as extremidades do capilar. Portanto, várias zonas de amostra participam do meio de separação, cada uma com uma matriz diferente. A própria zona de amostra de cátions contém HNO<sub>3</sub> e β - alanina em sua composição. Mesmo assim, concentrações de cátions estatisticamente equivalentes à amostra de referência foram obtidas através das devidas correções. Com o método sem calibração, o procedimento experimental para determinação de cátions pode ser reduzido, pois não há necessidade de preparar uma curva de calibração para quantificá-los. Porém, a quantificação sem calibração não seria possível se a equação 18 não fosse elaborada, pois os cálculos das mobilidades efetivas dos analitos são dependentes da mobilidade do fluxo eletrosmótico.

## 5 CONCLUSÃO DA PARTE I

O método desenvolvido para determinação de cátions, GT, GL apresentou resultados satisfatórios. As análises que, através dos métodos oficiais, necessitariam de equipamentos de absorção ou emissão atômica e cromatografia a gás podem ser realizadas em apenas um equipamento de CE. Apesar do preparo de amostra diferenciado para cátions, GT e GL, as etapas são essencialmente baseadas em diluições e centrifugação das amostras. Nenhum equipamento de ultrassom ou aquecimento é necessário para preparar as amostras. A extração dos cátions é rápida e pode ser realizada em menos de 5 minutos. As amostras de GL e GT são preparadas em menos de 10 e 20 minutos, respectivamente. Os resultados obtidos por CE são estatisticamente equivalentes aos obtidos pelos métodos DIN EN14538, NBR 15553, NBR 15556, NBR 15908, ASTM D 6584 e NBR 15908 com um nível de confiança de 95%.

O método para determinação de cátions, GT e GL também apresentou reprodutibilidade satisfatória, com valores calculados de *HorRat* entre 0,4 e 0,9. Em relação à repetibilidade dos diferentes analistas que aplicaram o método em diferentes laboratórios, houve casos pontuais em que o coeficiente de variação experimental foi maior que o previsto. Porém, leva-se em consideração que nem todos os laboratórios apresentavam equipamentos de centrifugação e agitação semelhantes aos utilizados durante o desenvolvimento do método. As condições de manutenção e limpeza dos equipamentos também são diferentes em cada laboratório. Os analistas também não receberam treinamento prévio com o método desenvolvido. Contudo, o desempenho interlaboratorial do método foi aceitável, com valores de *Z-score* entre a faixa de -1,08 a +1,38.

Para Simplificação de experimentos, a determinação de cátions também pode ser realizada através de método um método sem calibração. Os resultados obtidos demonstram que o método sem calibração também reproduz resultados equivalentes ao obtidos por métodos oficiais com 95% de nível de confiança. Entretanto, o tempo de migração dos cátions deve ser corrigido, o que pode ser realizado através de cálculos de mobilidade efetiva e mobilidade do fluxo eletrosmótico.

A estratégia para alteração dos eletroferogramas de tempo de migração para mobilidade efetiva dos analitos apresentou resultados interessantes. Os coeficientes de variação referentes às mobilidades efetivas dos analitos não ultrapassaram 0,9 %,

considerando análises em laboratórios diferentes. O procedimento para correção dos eletroferogramas com base em mobilidades efetivas é promissor, pois a falta de reprodutibilidade do tempo de migração dos analitos em CE é um fator que pode dificultar a identificação de picos.

## 6 PARTE II - DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE IODO EM AMOSTRAS DE BIODIESEL POR CZE-UV

### 6.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 6.1.1 Instrumentação

O equipamento de eletroforese capilar utilizado nas análises foi o modelo 7100 da *Agilent Technologies* equipado com um detector de arranjo de diodos e sistema de refrigeração a ar. Capilares de sílica (*Polymicro Technologies*) revestidos externamente por poliimida foram utilizados nas análises.

Agitadores Vortex do modelo QL-901 foram utilizados para homogeneização das amostras e soluções. Para centrifugar as amostras, foi utilizado um equipamento da marca *Eppendorf* modelo *MiniSpin Plus*.

#### 6.1.2 Padrões, soluções e amostras

Os padrões de ácido 6-aminocapróico e  $\text{NaNO}_3$  foram adquiridos da empresa *Sigma Aldrich* (São Paulo, Brasil). Uma solução de  $\text{NaI}$   $1000 \text{ mg L}^{-1}$  foi adquirida da empresa *Sigma Aldrich* (São Paulo, Brasil). O reagente de Wijs, cuja composição é  $1,0 \pm 0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{ICl}$  diluído em ácido acético glacial, foi adquirido da empresa *Sigma Aldrich* (São Paulo, Brasil). Uma Solução de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )  $2 \text{ mol L}^{-1}$  foi adquirida da empresa *SpecSol* (Jacareí-SP, Brasil). Ácido acético glacial, acetato de sódio e ácido clorídrico concentrado foram adquiridas da empresa *Synth*, (São Paulo, Brasil). O solvente clorofórmio foi adquirido da empresa *Tedia* (São Paulo, Brasil). Todos os padrões e soluções adquiridos apresentavam pureza  $\geq 99\%$ . Para preparo das soluções e amostras, água ultrapura foi obtida através de um sistema um sistema Milli-Q (*Millipore, Belford, MA, EUA*). As amostras certificadas para cátions de 5, 10 e  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  foram adquiridas da empresa *LGC Standards* e foram nomeadas como C1, C2 e C3, respectivamente. Uma amostra analisada por 12 laboratórios que utilizaram o método DIN EN 14111 foi adquirida da empresa Rede Metrológica e foi nomeada como amostra interlaboratorial. Uma amostra de biodiesel com laudo (ABL) para

índice de iodo também foi concedida pela empresa JBS. A amostra ABL também foi analisada através do método DIN EN 14111.

### 6.1.3 Otimização do eletrólito de corrida e condições operacionais do método

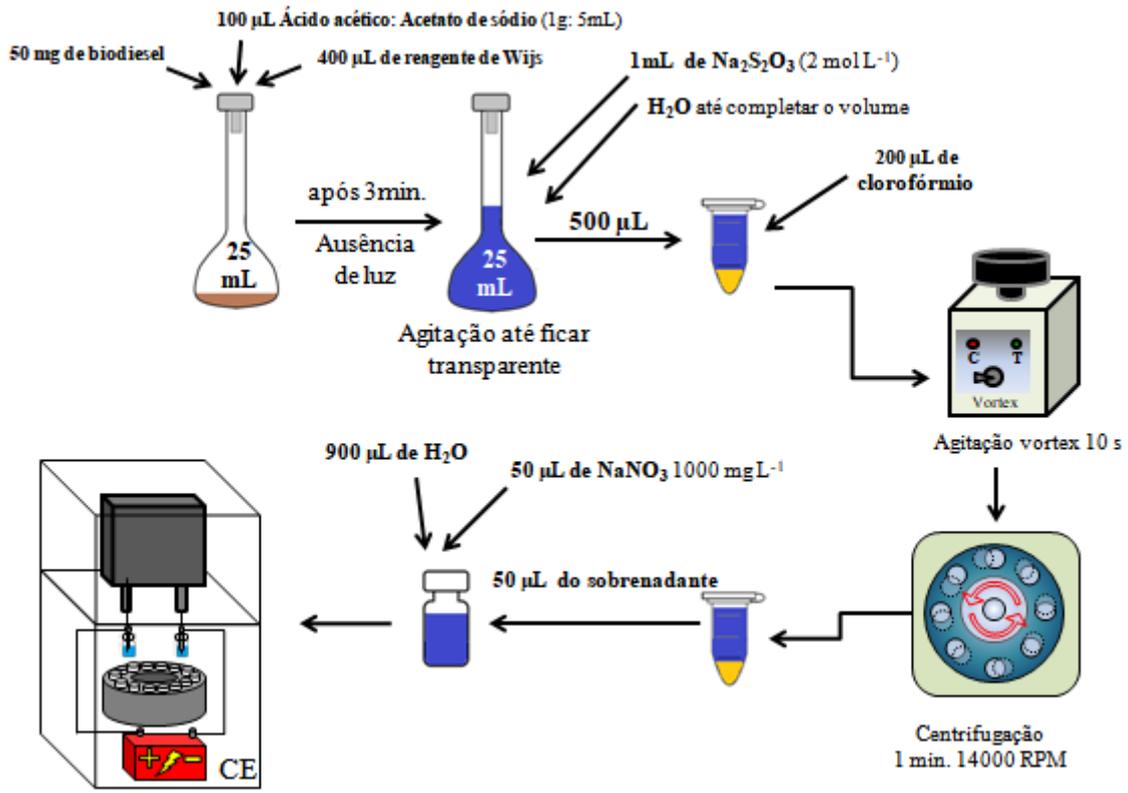
O eletrólito de corrida utilizado foi otimizado através do programa *Peakmaster 5.3*, em concentrações que variaram de 10 a 100 mmol L<sup>-1</sup> de ácido 6-aminocapróico, com concentração fixa de 10 mmol L<sup>-1</sup> de ácido clorídrico. Foram observados parâmetros como pH, capacidade tamponante do eletrólito e gradiente de velocidade relativa dos analitos para determinação da melhor composição do eletrólito de corrida.

As análises foram realizadas com temperatura configurada em 25 °C. A injeção das amostras foi realizada de maneira hidrodinâmica pela extremidade mais afastada da janela de detecção com pressão de 50 mbar por 5 s. A voltagem de separação foi fixada em -30 kV (negativa no eletrodo de injeção). O capilar utilizado foi de 48,5 cm com diâmetro interno de 50 µm. Para validação do método, foi utilizado um eletrólito de corrida composto por 50 mmol L<sup>-1</sup> de ácido 6-aminocapróico e 10 mmol L<sup>-1</sup> de HCl, pH= 5,02. Os comprimentos de onda monitorados para as análises foram de 230 nm para o I<sup>-</sup> e 210 nm para o NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

### 6.1.4 Preparo das amostras para determinação do índice de iodo

Aproximadamente 50 mg de biodiesel foram pesados em um balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução catalisadora (acetato de sódio: ácido acético 1 g: 5 mL) e 400 µL de reagente de Wijs no balão. A reação foi realizada na ausência de luz durante 3 minutos e com agitações ocasionais. Após 3 minutos foi adicionado no balão 1 mL de solução de tiosulfato 2 mol L<sup>-1</sup>. A solução foi agitada até que a cor marrom do reagente de Wijs desaparecesse completamente. Em seguida, água deionizada foi adicionada até completar os 25 mL do balão volumétrico. Posteriormente, 500 µL da solução foram transferidos do balão volumétrico para um frasco *Eppendorf*. No frasco *Eppendorf* também foram adicionados 200 µL de clorofórmio. A solução então foi agitada (vortex) por 10 segundos e centrifugada por 60 s a 14000 rpm. Em seguida, 50 µL do sobrenadante foram diluídos com 900 µL de água deionizada e 50 µL solução de nitrato de sódio 1000 mg L<sup>-1</sup>. O preparo de amostra simplificado está representado no fluxograma da figura 11.

Figura 21: Preparo de amostra para determinação do índice de iodo em amostras de biodiesel.



Fonte: O autor.

### 6.1.5 Validação do método

O método proposto foi validado em termos de especificidade, linearidade, faixa linear, especificidade, precisão instrumental, precisão *intraday*, precisão *interday*, limite de quantificação, limite de detecção e exatidão. A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e do valor de  $F_{\text{calculado}}$  na faixa de concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  a  $90 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\Gamma$ . Os níveis da curva de calibração ( $n = 8$ ) foram preparados de maneira que as concentrações finais de  $\text{NO}_3^-$  (padrão interno) e  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  fossem  $50 \text{ mg L}^{-1}$  e  $4 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente. Os dados obtidos para elaboração da curva de calibração externa (CCE) também foram utilizados para a geração da curva por fator de resposta, utilizada na calibração de ponto único (CPU). Estudos estatísticos de homocedasticidade, normalidade e verificação de *outliers* também foram realizados através dos testes de *Cochran*, *Shapiro-Wilk* e *Grubbs*.

A avaliação da precisão, LOQ e LOD para o método foi realizada de maneira simultânea para a CCE e CPU. A precisão *intraday* foi avaliada em todos os níveis de concentração da curva de calibração em triplicata. A precisão *interday* foi realizada em três dias diferentes para todos os níveis de concentração da curva de calibração. A precisão instrumental foi avaliada pela injeção consecutiva (n=10) do nível da curva de calibração correspondente a 40 mg L<sup>-1</sup> de I<sub>2</sub>. Os parâmetros de precisão foram avaliados através dos coeficientes de variação (% CV).

Os limites de quantificação e detecção foram avaliados pela relação sinal-ruído 10:1 e 3:1. A exatidão foi avaliada através da comparação estatística (teste-t) dos valores de referência dos índices de iodo das amostras interlaboratorial e ABL com o valor encontrado pelo método desenvolvido.

#### **6.1.6 Programas para tratamentos de dados**

Para tratamento dos dados, foram utilizados o *Software Microsoft Excel* e *PAST* versão 3.23 (março de 2019). O *software Excel* possui funções estatísticas importantes como a ferramenta de análise de dados ANOVA. O programa *PAST* apresenta diversas funções estatísticas importantes como, por exemplo, o teste de *Shapiro-Wilk* para verificação da normalidade dos resíduos.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 ESTRATÉGIA DE ANÁLISE

O método oficial para determinação do índice de iodo (EN 14111) é baseado em uma titulação, como descrito na seção 1.3.4. Para realização do método EN 14111, Após a reação do reagente de Wijs com as insaturações do óleo ou biodiesel, existe uma etapa de conversão do ICl remanescente da reação para  $I_2$  através da adição de KI. Depois,  $I_2$  é titulado com solução padronizada de  $S_2O_3^{-2}$ .

Alguns pontos relativos ao método oficial podem ser melhorados. A reação de Wijs demora aproximadamente 30 minutos para ser finalizada. A adição de um catalisador ao meio reacional pode aumentar a velocidade de reação. O catalisador pode ser composto por uma mistura de ácido acético glacial com acetato de sódio, que reduz o tempo de reação de Wijs de 30 para 3 minutos (MAKINO, 1980).

A conversão de ICl para  $I_2$  é uma etapa que não é necessária quando a análise é realizada por CE. A tabela 19 apresenta potenciais de redução para a reação entre ICl e  $S_2O_3^{-2}$ . Quando o potencial da reação é positivo, a variação da energia livre de Gibbs é negativa e a reação é espontânea (SUNDÉN, 2019). A reação entre ICl e  $S_2O_3^{-2}$  produz  $I^-$ , que pode ser quantificado por CE. Outro fator aprimorado é que a etapa de padronização de  $S_2O_3^{-2}$  com  $K_2Cr_2O_7$  é desnecessária para a aplicação do método, pois mede-se a quantidade de  $I^-$  formado e não a quantidade de solução de  $S_2O_3^{-2}$  consumido na titulação. Contudo que seja adicionado excesso de  $S_2O_3^{-2}$  para converter todo ICl para  $I^-$ , não haverá problemas em relação a quantificação, mesmo que a concentração de  $S_2O_3^{-2}$  não seja exatamente conhecida. A quantificação então é realizada pela diferença entre o ICl adicionado em excesso no início da reação e o  $I^-$  encontrado através da análise por CE.

Após a reação entre ICl e  $S_2O_3^{-2}$ , é realizado uma LLE com clorofórmio para separar o biodiesel da fase aquosa. A fase aquosa então é diluída com padrão interno antes de ser injetada. No método oficial, aproximadamente 15 mL de clorofórmio são utilizados para a análise de cada amostra. Porém, como a determinação de índice de iodo no método proposto é realizada com uma pequena alíquota da amostra, o uso de clorofórmio é reduzido para apenas 200  $\mu$ L por amostra.

Portanto, em relação ao método EN 14111, o método proposto é menos laborioso, gera menor quantidade de resíduos, consome pouco reagente e também é mais rápido, aprimorando assim a frequência analítica.

Tabela 19: Semi-reações envolvidas na formação de  $\Gamma$  e potenciais-padrão de redução.

Semi-reações <sup>a</sup>	Potencial de redução padrão <sup>a</sup>
$2 \text{ICl}_{(s)} + 2e^- \rightleftharpoons \text{I}_2 + 2\text{Cl}^-$	$E_{\text{red}}^0 = + 1,22$
$\text{S}_2\text{O}_3^{-2} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{H}_2\text{SO}_3 + 3\text{H}^+ + 4e^-$	$E_{\text{red}}^0 = - 0,14$
$\text{I}_{2(\text{aq})} + 2e^- \rightleftharpoons 2\Gamma$	$E_{\text{red}}^0 = + 0,62$
Reação global	Potencial de reação
$2\text{ICl}_{(s)} + \text{S}_2\text{O}_3^{-2} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{H}_2\text{SO}_3 + 3\text{H}^+ + 2\Gamma + 2\text{Cl}^-$	$E_{\text{global}}^0 = + 1,44$

<sup>a</sup> Semi-reações e potenciais adaptados de Harris (2007).

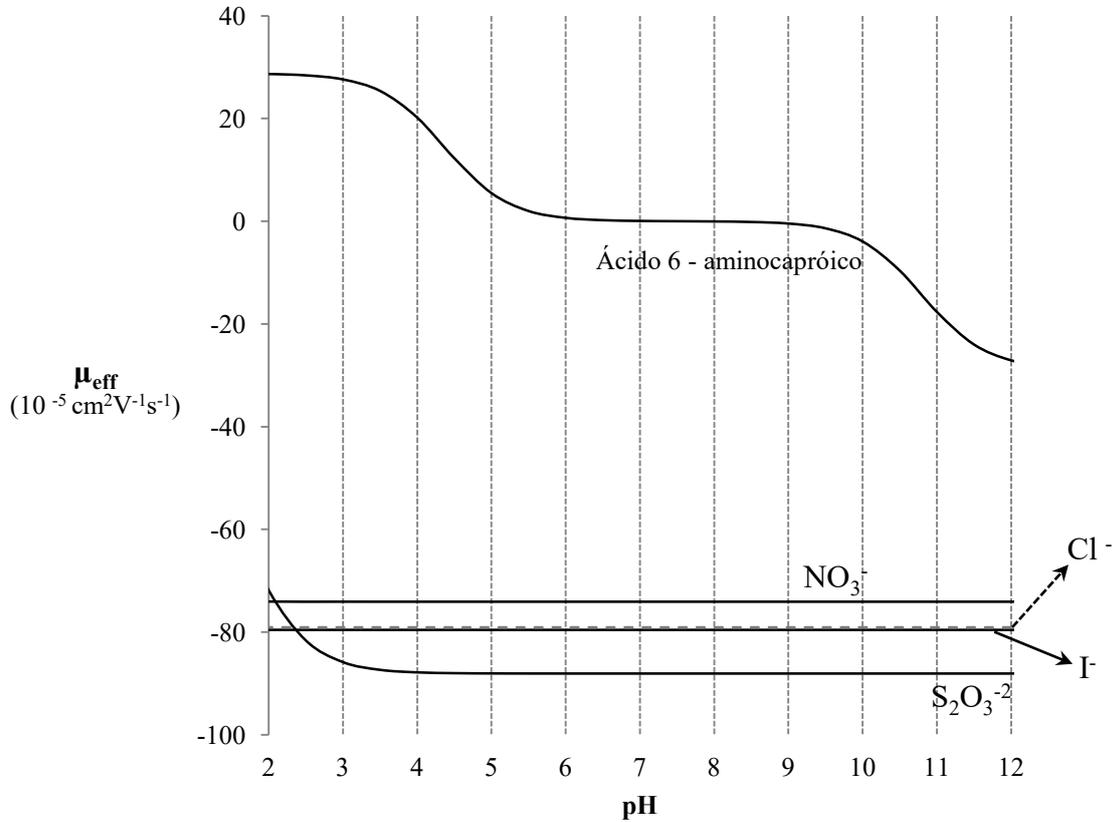
Fonte: O autor.

## 7.2 OTIMIZAÇÃO DO ELETRÓLITO DE CORRIDA

O eletrólito de corrida é composto por ácido 6-aminocaprílico e ácido clorídrico. O ácido clorídrico foi escolhido devido à semelhança entre as mobilidades iônicas do  $\Gamma$  e  $\text{Cl}^-$ . De acordo com a base de dados do programa *Peakmaster 5.3*, as mobilidades iônicas do  $\Gamma$  e  $\text{Cl}^-$  são 79,1 e 79,6 ( $10^{-5} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Embora o  $S_A$  do analito seja o fator que mede a capacidade do pico de sofrer efeitos de EMD, a semelhança entre mobilidades efetivas do analito e do co-íon ainda é um ponto inicial interessante para escolher o componente do eletrólito de corrida. O eletroferograma experimental (figura 23) mostra que a escolha do íon  $\text{Cl}^-$  como co-íon para  $\Gamma$  apresentou resultados satisfatórios, pois o pico de  $\Gamma$  é simétrico e estreito.

Realizar a análise em pH ácido é interessante porque o  $\Gamma$  migra em direção oposta ao fluxo eletrosmótico. Porém, há regiões na faixa de pH ácido onde os analitos podem comigrar. De acordo com a figura 22, as mobilidades efetivas dos íons  $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$  e  $\Gamma$  são equivalentes em pH de aproximadamente 2,5 e, em pH próximo de 2, os íons  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$  podem comigrar. Observa-se também que a mobilidade efetiva do  $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$  é constante a partir de pH 4. Portanto, é interessante utilizar, em conjunto com HCl, um composto que produza capacidade tamponante do eletrólito em pH acima de 4 e na faixa ácida. Esse efeito pode ser obtido através da adição do ácido 6-aminocaprílico que apresenta valores de pKa de 4,37 e 10,8 (EDSSAL; WYMAN, 2014). Portanto, o eletrólito contendo ácido 6-aminocaprílico apresenta capacidade tamponante nas faixas de pH entre 3,37-5,37 e 9,8 - 11,8.

Figura 22: Curva de mobilidades efetiva ( $\mu_{\text{eff}}$ ) vs pH para os analitos e componentes do eletrólito.



Fonte: O autor.

A tabela 20 foi construída com bases em simulações realizadas através do programa *Peakmaster 5.3* e representa os valores de capacidade tamponante, gradiente de velocidade relativa do analito ( $S_A$ ) e pH para um eletrólito composto por  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de HCl contendo diferentes concentrações de ácido 6 - aminocaprílico. Nota-se que, a capacidade tamponante do eletrólito não aumenta significativamente após a adição de  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido 6 - aminocaprílico. Os valores de  $S_A$  para todos os analitos também não apresentam mudança significativa nas condições simuladas. Portanto, o eletrólito de corrida selecionado para desenvolvimento do método foi composto por  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de HCl e  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido 6-aminocaprílico.

Tabela 20: Parâmetros de otimização do eletrólito de corrida.

Ácido 6-aminocapróico (mmol L <sup>-1</sup> )	Capacidade Tamponante (mmol L <sup>-1</sup> )	pH	$S_A$ (10 <sup>-3</sup> Sm <sup>2</sup> mol <sup>-1</sup> )		
			I <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup>
20	11,9	4,42	0,0633	0,646	-0,556
30	15,8	4,71	0,0629	0,641	-0,554
40	17,8	4,89	0,0629	0,640	-0,555
50	19,1	5,02	0,0627	0,639	-0,556
60	19,9	5,12	0,0626	0,639	-0,556
70	20,5	5,19	0,0626	0,638	-0,556
80	20,9	5,26	0,0626	0,638	-0,556
90	21,3	5,32	0,0626	0,638	-0,556
100	21,5	5,37	0,0625	0,638	-0,556

Fonte: O autor.

Apesar dos valores simulados de  $S_A$  serem próximos de zero, os resultados experimentais mostraram que, para o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup>, houveram efeitos de alargamento frontal e caudal (figura 23). Porém, não houve comigração dos picos e, portanto, não foi necessário alterar a composição do eletrólito.

### 7.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O método foi validado em dois modos de calibração: a curva de calibração externa (CCE) e a calibração de ponto único (CPU). Para realizar a CPU é necessário que um conjunto de níveis de concentração do analito seja linear em uma determinada faixa, assim como também ocorre na CCE (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2007). Portanto, para ambos os modelos de calibração, foram obtidas equações da curva, que estão representadas na tabela 21. Nas equações apresentadas,  $A_{I^-}$ ,  $A_{NO_3^-}$ ,  $c_{I^-}$  e  $c_{NO_3^-}$  referem-se às áreas dos picos de I<sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, e as concentrações de I<sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente. Na CPU, a razão entre  $c_{I^-}$  e  $c_{NO_3^-}$  é realizada porque a quantificação na CPU é realizada através do fator de resposta, que é o coeficiente angular da equação.

A curva de regressão da CPU também deve ter um coeficiente linear ( $b_0$ ) nulo (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2007). Na prática, ao elaborar uma curva de calibração, dificilmente  $b_0$  é exatamente igual à zero. Porém,  $b_0$  pode considerado estatisticamente igual a zero se  $-t_{\alpha/2} < b_0/s_0 < +t_{\alpha/2}$ , onde  $t$  é o valor de  $t$  crítico (tabela  $t$ ) para um determinado nível de significância ( $\alpha$ ) e  $s_0$  é o desvio padrão do coeficiente linear. (BÁNFAI; KEMÉNY, 2012;

DA ROCHA *et al.*, 2018). Para CPU o  $b_0$  foi estatisticamente considerado nulo, pois a curva de calibração com 8 níveis (6 graus de liberdade) apresentou  $b_0/s_0 = 0,11$ , sendo que o valor de  $\pm t_{\alpha/2}$  com  $\alpha = 0,05$  é de aproximadamente  $\pm 2,97$ . Portanto, os dois requisitos mínimos para a CPU foram cumpridos.

A tabela 21 mostra os resultados da validação do método proposto. A faixa linear para os dois modelos é equivalente e, de acordo com os valores de  $F_{\text{calculado}}$  e  $r^2$ , não há falta de ajuste do modelo linear.

Tabela 21: Parâmetros de validação do método proposto utilizando formas de calibração diferentes.

Parâmetro	CCE	GPU
Equação da curva	$\frac{A_{I^-}}{A_{NO_3^-}} = 0,0125 c_{I^-} + 0,0062$	$\frac{A_{I^-}}{A_{NO_3^-}} = 0,6239 \frac{c_{I^-}}{c_{NO_3^-}}$
Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	5,0 – 90,0	
Linearidade	$F_{\text{calculado}} = 0,296 < [F_{(0,05,6,14)} = F_{\text{crítico}} = 2,74] r^2 = 0,9998$	
Precisão Instrumental (% CV)	1,1	
Precisão <i>Intraday</i> (% CV)	0,04 – 1,0	
Precisão <i>Interday</i> (% CV)	1,5 – 6,0	
LOQ <sup>a</sup> (g de I <sub>2</sub> / 100 g de biodiesel)	0,6	
LOD <sup>b</sup> (g de I <sub>2</sub> /100 g de biodiesel)	0,2	
(teste-t com $\alpha=0,05$ )		
Exatidão <sup>c</sup>	Amostra interlaboratorial: $t_{\text{calculado}} = -0,87$ ( $t_{\text{crítico}} = \pm 2,16$ )	Amostra interlaboratorial: $t_{\text{calculado}} = -1,72$ ( $t_{\text{crítico}} = \pm 2,16$ )
	Amostra ABL: $t_{\text{calculado}} = \pm 2,70$ ( $t_{\text{crítico}} = \pm 2,78$ )	Amostra ABL: $t_{\text{calculado}} = \pm 2,39$ ( $t_{\text{crítico}} = \pm 2,78$ )

<sup>a</sup> Considerando as mesmas massas e volumes descritos no procedimento experimental. Baseado na relação sinal : ruído de 10:1. Convertido para valores de ICL, o LOQ é de 0,38 (g de I<sub>2</sub>/g de biodiesel).

<sup>b</sup> Considerando as mesmas massas e volumes descritos no procedimento experimental. Baseado na relação sinal : ruído de 3:1. Convertido para valores de ICL, o LOQ é de 0,12 (g de I<sub>2</sub>/g de biodiesel).

<sup>c</sup> Amostra interlaboratorial foi analisada por 12 laboratórios e a amostra AB L foi analisada por um laboratório. Ambas usaram o método oficial DIN EN 14111.

Fonte: O autor.

Como demonstrado na tabela 21, a precisão instrumental apresentou variação de apenas 1,1 % de CV e a precisão *intraday* não ultrapassou 1,0 % de CV. Entre a faixa linear proposta, os valores de CV % previstos pela equação de *Horwitz* (equação 17) para a precisão *intraday* (repetibilidade) estão entre 4 e 6 %. Portanto, desvios menores que o previsto foram obtidos, mostrando que a repetibilidade do método é satisfatória. A precisão *interday* foi inferior a 6,0 % de CV. Os valores calculados de LOQ e LOD foram de 0,6 e 0,2 g de I<sub>2</sub> para 100 g de biodiesel e são válidos para CCE e CPU, pois a relação sinal: ruído é obtida através do mesmo eletroferograma para ambos os casos.

Ambas as formas de calibração foram utilizadas para cálculo de índices de iodo das amostras e, de acordo com o teste-t, os índices de iodo obtidos a partir do método proposto foram equivalentes aos valores de referência com um nível de confiança de 95%. A especificidade do método é confirmada não apenas pela exatidão do método, mas também pela pureza do pico de I calculado pelo *software Chemstation*.

#### 7.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As amostras foram quantificadas através da CPU e CCE. Ao utilizar o coeficiente angular da equação de CPU como fator de resposta para cálculo, valores semelhantes aos encontrados por CCE são obtidos (tabela 22). O reagente de Wijs também foi quantificado pelo mesmo procedimento, para corrigir a variação apresentada em seu rótulo ( $1,0 \pm 0,2$  mol L<sup>-1</sup> de ICl). A concentração encontrada do reagente de Wijs pelo método proposto foi de  $1,04 \pm 0,09$  mol L<sup>-1</sup>. Essa concentração calculada foi utilizada para determinar quanto de ICl foi adicionado inicialmente em cada preparo de amostra. A tabela 22 indica que quatro amostras ultrapassaram os limites estipulados pela norma EN 14214 de 120 g de I<sub>2</sub> para 100 g de biodiesel. Porém, pela RANP-45, nenhuma amostra seria reprovada, pois o valor do índice de iodo deve apenas ser anotado.

Tabela 22: Índices de iodo calculados através do método proposto com CCE e CPU.

Amostra	Índice de iodo (g de I <sub>2</sub> /g de biodiesel)	
	CCE	CPU
interlaboratorial <sup>a</sup>	132 ± 1	131 ± 1
C1	126 ± 3	126 ± 3
C2	128 ± 5	128 ± 5
C3	124 ± 5	124 ± 5
ABL <sup>b</sup>	58 ± 3	57 ± 3

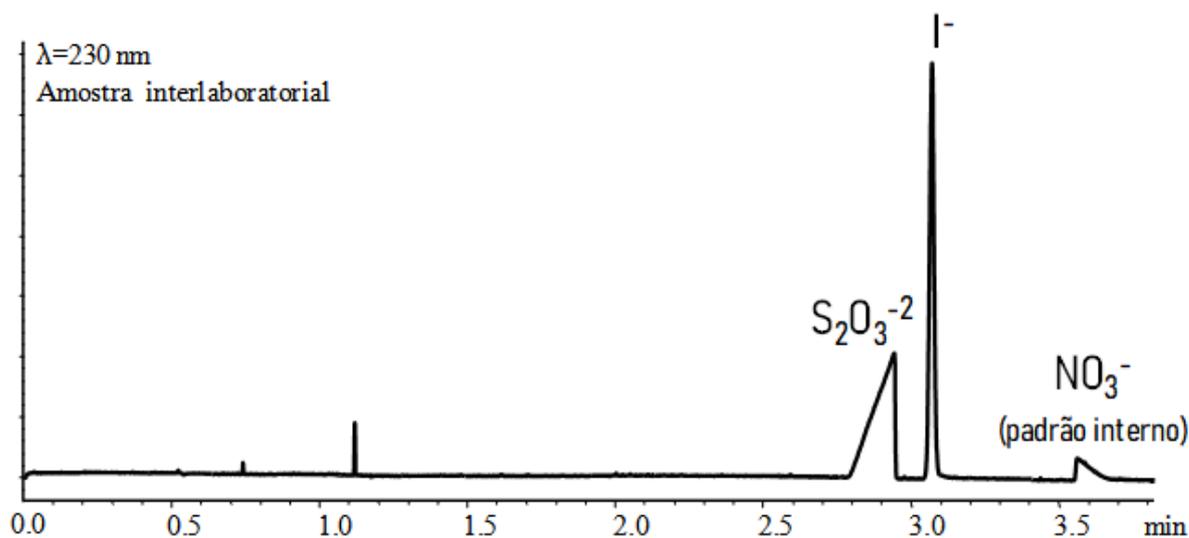
<sup>a</sup> Método de referência: DIN EN 14111, quantificado por 12 laboratórios. Valor de referência: 130 ± 2.

<sup>b</sup> Método de referência: DIN EN 14111, quantificado por 1 laboratórios. Valor de referência: 62 ± 1.

Fonte: O autor.

A Figura 23 mostra um eletroferograma da amostra interlaboratorial em 230 nm. A concentração de I<sup>-</sup> é inversamente proporcional ao índice de iodo da amostra, pois o I<sup>-</sup> reflete a quantidade de ICl que sobrou após a reação de Wijs. No eletroferograma também é observado o S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup> remanescente.

Figura 23: Eletroferograma referente à análise da amostra interlaboratorial.



Fonte: O autor.

## 7.5 COMPARAÇÃO ENTRE CPU E CCE

A proposta de utilizar a CPU é utilizar apenas um nível de concentração de  $\Gamma$  para obter um fator de resposta que será utilizado para cálculo do índice de iodo das amostras. Porém, cada nível  $i$  de concentração de  $\Gamma$  produz um fator de resposta um pouco diferente do fator de resposta obtido através da regressão linear. A equação 19 pode ser utilizada para cálculo dos fatores de respostas ( $RF_i$ ) em cada nível  $i$  de concentração de  $\Gamma$  ( $c_{\Gamma-i}$ ). As áreas dos picos de  $\Gamma$  e  $\text{NO}_3^-$  em um nível  $i$  de concentração de  $\Gamma$  são representadas por  $A_{\Gamma-i}$  e  $A_{\text{NO}_3^-_i}$ , respectivamente. A concentração de  $\text{NO}_3^-$  ( $c_{\text{NO}_3^-}$ ) é constante e independe do nível.

$$\frac{A_{\Gamma-i}}{A_{\text{NO}_3^-_i}} = RF_i \frac{c_{\Gamma-i}}{c_{\text{NO}_3^-}} \quad (19)$$

Ao calcular os fatores de resposta para os níveis de concentração de 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 90 mg de mg L<sup>-1</sup> de  $\Gamma$  e, através de cada um dos fatores, calcular o índice de iodo para as amostras testadas, são obtidos os valores descritos na tabela 23.

A tabela 23 mostra que, no nível de concentração de 5 mg L<sup>-1</sup>, o fator de resposta calculado é superior aos valores obtidos em outros níveis. Desse modo, os índices de iodo calculados das amostras foram inferiores aos valores obtidos em outros níveis. Para comparar os índices de iodo das amostras obtidos em cada nível de concentração com os índices obtidos pela CCE (tabela 22), foi realizado o teste t. O objetivo desse teste é confirmar quais níveis de concentração de  $\Gamma$  podem ser utilizados como referência para CPU. A tabela 24 mostra os valores de t calculados para todos os níveis da curva com  $\alpha = 0,05$ . Para o nível de concentração de 5 mg L<sup>-1</sup>, todos os valores de t calculados para as cinco amostras ultrapassaram o t crítico. Em 10 mg L<sup>-1</sup> de  $\Gamma$ , duas amostras foram estatisticamente diferentes. A partir de 20 mg L<sup>-1</sup>, todos os resultados obtidos por CPU são equivalentes aos valores obtidos por CCE.

Tabela 23: Índices de iodo calculados através dos fatores de resposta obtidos em cada nível da curva.

Amostra	Nível de concentração de $\Gamma$ ( $\text{mg L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>							
	5	10	20	30	40	60	80	90
	$RF_i$ <sup>b</sup>							
	0,794	0,673	0,639	0,623	0,631	0,632	0,628	0,627
Amostra	Índice de Iodo ( $\text{I}_2$ g/ 100 g de biodisel)							
interlaboratorial	103 ± 1	122 ± 1	128 ± 1	131 ± 1	130 ± 1	129 ± 1	131 ± 1	132 ± 1
C1	99 ± 2	117 ± 1	123 ± 3	126 ± 3	125 ± 3	125 ± 3	126 ± 3	127 ± 3
C2	101 ± 4	119 ± 5	125 ± 5	128 ± 5	127 ± 5	127 ± 5	128 ± 5	129 ± 5
C3	97 ± 4	115 ± 5	121 ± 5	124 ± 5	122 ± 5	122 ± 5	123 ± 5	124 ± 5
ABL	45 ± 2	54 ± 3	56 ± 3	58 ± 3	57 ± 3	57 ± 3	57 ± 3	58 ± 3

<sup>a</sup> Os níveis reais da CPU são obtidos dividindo cada um dos valores de concentração de  $\Gamma$  pela concentração de  $\text{NO}_3^-$  ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), como mostra a equação 19. Porém, para simplificar a visualização dos níveis, a concentração de  $\Gamma$  está representada diretamente.

<sup>b</sup> O Desvio padrão de cada  $RF_i$  não ultrapassa 0,02 e, portanto, a incerteza da medida foi ocultada.

Fonte: O autor.

Tabela 24: Comparação estatística (teste t) dos valores obtidos por CCE e CPU para cada nível de concentração de  $\Gamma$ .

amostra	Nível de concentração de $\Gamma$ ( $\text{mg L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>							
	5	10	20	30	40	60	70	90
amostra	t calculado <sup>b</sup>							
interlaboratorial	-26	-7,8	-2,2	0,6	-0,8	-0,9	-0,1	0,6
C1	-12	-4	-1,4	-0,2	-0,8	-0,9	-0,6	-1,1
C2	-7,5	-2,5	-0,9	-0,1	-0,5	-0,6	-0,3	-0,5
C3	-7,2	-2,4	-0,9	-0,1	-0,3	-0,5	-0,3	-0,3
ABL	-6	-2	-0,7	-0,1	-0,4	-0,4	-0,3	-0,3

<sup>a</sup> Os níveis reais da CPU são obtidos dividindo cada um dos valores de concentração de  $\Gamma$  pela concentração de  $\text{NO}_3^-$  ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), como mostra a equação 19. Porém, para simplificar a visualização dos níveis, a concentração de  $\Gamma$  está representada diretamente.

<sup>b</sup> Para  $\alpha = 0,05$  e 4 graus de liberdade, o t crítico é  $\pm 2,78$ . Valores realçados ultrapassaram os limites entre o t crítico.

Fonte: O autor.

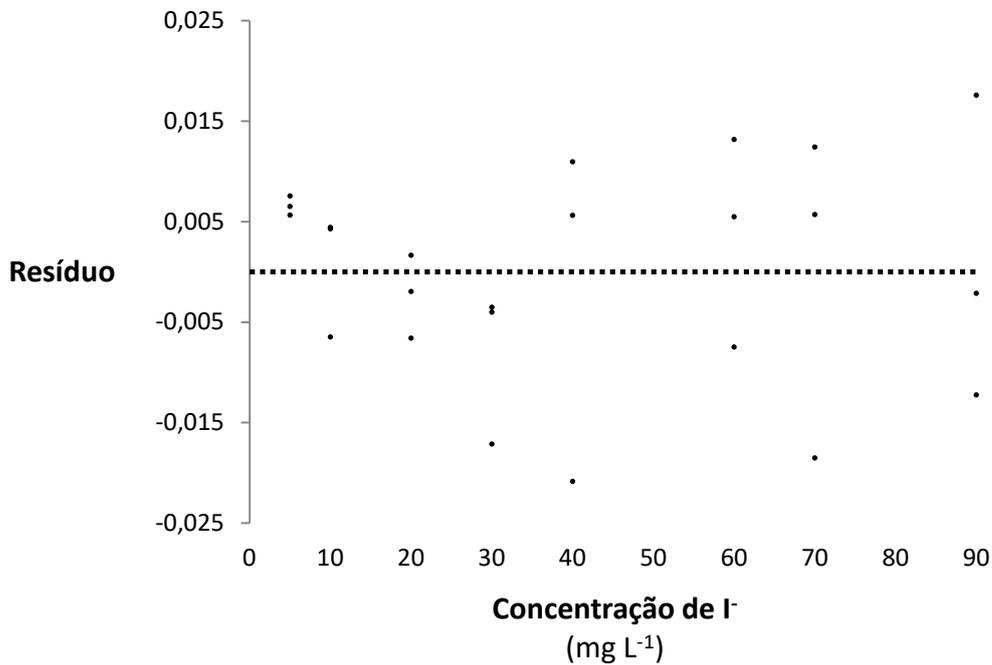
O resultado obtido através do teste t (tabela 24) não indica que amostras cujos índices de iodo encontram-se na região correspondente entre 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de I não podem ser quantificados com exatidão. Os resultados da tabela 24 mostram que, para selecionar o ponto único de referência para realizar uma CPU, o ponto escolhido deve estar entre 20 e 90 mg L<sup>-1</sup>. Quanto mais próximo o t calculado for de zero, mais a média obtida pela CPU é semelhante a CCE.

As diferenças obtidas nos fatores de resposta em 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> não são referentes a falta de linearidade do modelo, pois o valor de F<sub>calculado</sub> (tabela 21) é inferior ao F<sub>crítico</sub>. A análise da regressão linear através da ANOVA do Software *Excel* também comprova a linearidade do modelo. O valor de F fornecido pelo *software* com um nível de confiança de 95% ( $\alpha = 0,05$ ) foi de 55258 enquanto o Valor-p foi 0,0793. Como descrito na literatura, quando  $F \geq \text{valor-p}$ , existe relação linear entre a resposta e a concentração e o coeficiente angular da curva de regressão é diferente de zero. Quando  $\alpha \leq \text{valor-p}$  a linearidade é estatisticamente aceita. A verificação de  $\alpha$  em relação a valor-p é um teste de falta de ajuste do modelo (CARDOSO *et al.*, 2010).

O teste de Cochran também foi utilizado para verificar se as variâncias são constantes independentemente do nível de concentração (homocedasticidade). Para o teste de Cochran, calcula-se o valor de C (equação 20), que é uma razão entre a maior variância obtida entre as respostas de todos os níveis ( $s_{y\max}^2$ ) e a soma de todas as variâncias da resposta em cada nível ( $s_{y\ i}^2$ ) (DOS REIS, 2017). Quando  $C < C_{\text{crítico}}$ , o modelo é homocedástico e caso  $C \geq C_{\text{crítico}}$ , o modelo é heterocedástico (DOS REIS, 2017). O modelo experimental é homocedástico com 95 % de nível de confiança, pois o valor de C calculado foi 0,287, sendo que o valor de  $C_{\text{crítico}}$  para 8 níveis e três replicas em cada nível é de 0,516. A homocedasticidade também é comprovada através da distribuição aleatória dos resíduos e nenhuma tendência é observada (figura 24).

$$C = \frac{s_{y\max}^2}{\sum_i^n s_{y\ i}^2} \quad (20)$$

Figura 24: Distribuição dos resíduos em cada nível de concentração de  $\Gamma$ .



Fonte: O autor.

A distribuição normal dos resíduos também pode ser observada através do teste de *Shapiro - Wilk*. O teste é baseado no cálculo de  $W$  através da equação 21 (FÁVERO; BELFIORE, 2019; SHAPIRO, 1965). Na equação 21,  $n$  é o número total resultados,  $x_k$  é um resultado específico e  $\bar{x}$  é a média de todos os resultados. O valor de  $b$  é constante e depende de constantes que estão tabeladas. O valor de  $b$  é calculado pela equação 22 ou 23. O termo  $a_{n-1+1}$  são as constantes tabeladas (SHAPIRO, 1965). Quando o valor de  $W$  é superior ao valor tabelado de  $W_{\text{crítico}}$ , para um nível de significância  $\alpha$ , não há falta de normalidade dos resultados avaliados (FÁVERO; BELFIORE, 2019; SHAPIRO, 1965).

$$W = \frac{b^2}{\sum_{k=1}^n (x_k - \bar{x})^2} \quad (21)$$

$$\{b = \sum_{k=1}^{n/2} a_{n-1+1} \cdot (x_{(n-1+1)} - x_i)\}_{se\ n\ é\ par} \quad (22)$$

$$\{b = \sum_{k=1}^{(n+1)/2} a_{n-1+1} \cdot (x_{(n-1+1)} - x_i)\}_{se\ n\ é\ ímpar} \quad (23)$$

Para simplificação dos cálculos o programa *PAST* foi utilizado para cálculo de  $W$ . Como  $W_{crítico} = W_{(0,05;24)} = 0,915$  e  $W_{calculado} = 0,9569$ , os resíduos seguem uma distribuição normal com 95% de nível de confiança. O valor de  $p$  normal calculado pelo *PAST* também confirma a distribuição normal, pois o  $p$  normal =  $0,38 > 0,05$ .

O teste de *Grubbs* também foi realizado para identificar se os níveis de 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> são possíveis *Outliers*. No teste de *Grubbs*, calcula-se o valor de  $G$  através da equação 24, onde  $y_i$  é resposta individual,  $\bar{y}$  é a média entre todas as respostas e  $S_a$  é o desvio padrão amostral (DAN; IJEOMA, 2013; GRUBBS, 1969). Para verificar se existem *outliers* em uma regressão linear, os valores de  $y_i$  e  $\bar{y}$  são referentes aos resíduos da curva (YOUNG, 2018). O valor de  $G$  é comparado ao  $G_{crítico}$ , obtido em tabelas de testes bicaudais ou unilaterais (GRUBBS, 1969). Caso  $G < G_{crítico}$  o valor não é considerado um *outlier* e não há valores discrepantes no modelo (CARDOSO *et al.*, 2010).

$$G = \frac{|y_i - \bar{y}|}{s_a} \quad (24)$$

A tabela 25 mostra os valores de  $G$  obtidos para os resíduos em cada replicata e nível da curva de  $\Gamma$ . Nenhum resultado obtido foi superior ao  $G_{crítico}$  de 2,81. Portanto, com 95% de nível de confiança, não há níveis da curva de calibração que devem ser considerados *outliers*.

Tabela 25: Resultados do teste G para os resíduos de cada nível de concentração de  $\Gamma$ .

Concentração de $\Gamma$ (mg L <sup>-1</sup> )	$G_{replicata\ 1}$	$G_{replicata\ 2}$	$G_{replicata\ 3}$
5	0,550	0,736	0,634
10	0,632	0,431	0,416
20	0,643	0,161	0,191
30	1,670	0,391	0,343
40	2,032	0,548	1,067
60	0,729	0,534	1,284
70	1,804	0,555	1,210
90	0,208	1,194	1,713

Para  $\alpha = 0,05$  e teste bicaudal,  $G_{crítico} = 2,81$ .

Fonte: O autor.

As informações obtidas através dos testes de *Cochran*, *Grubbs* e *Shapiro - Wilk* não mostraram, em conjunto, nenhuma evidência de que os pontos de 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de  $\Gamma$  devem ser excluídos da curva de regressão ou que há problema na linearidade do método.

A principal causa da diferença então se resume a incapacidade dos dois primeiros pontos da curva em promover mudanças na linearidade. Nos níveis de 20 e 90 mg L<sup>-1</sup> de  $\Gamma$ , a proporcionalidade entre concentração e resposta são muito parecidas entre si. Em 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de  $\Gamma$ , a proporcionalidade entre concentração e resposta é um pouco diferente dos outros 6 níveis. Isso pode ser observado através dos fatores de resposta obtidos em cada nível na tabela 23. Ao realizar a regressão linear, os níveis de 20 a 90 mg L<sup>-1</sup> são os que mais influenciam no ajuste da reta, pois estão em maior número de níveis e apresentam proporcionalidades mais próximas entre si. A variação de proporcionalidade nos dois primeiros níveis da curva não é grande o suficiente para promover uma falta de ajuste do modelo linear como um todo. Porém, individualmente, são capazes de promover mudanças significativas na quantificação.

Portanto, o teste t foi importante para identificar os níveis de concentração de  $\Gamma$  que podem ser utilizados na CPU. Esse trabalho comprova que, para a CPU, além do coeficiente linear da regressão ser estatisticamente nulo e haver uma faixa linear de concentração, também é necessário identificar os níveis que podem ser utilizados individualmente.



## 8 CONCLUSÃO DA PARTE II

O método para determinação de índice de iodo em amostras de biodiesel por CE foi desenvolvido com sucesso. Em comparação ao método oficial EN 14111, o consumo de clorofórmio e reagente de Wijs foi reduzido de níveis de mL para  $\mu\text{L}$ . O tempo para reação de Wijs também foi reduzido de 30 para 3 min. A etapa de padronização de solução de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  com  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  também não foi mais necessária. Portanto, o método proposto apresenta diversas vantagens em termos de química verde e frequência analítica. O método também oferece mais segurança ao analista, pois o mesmo não precisará manipular grandes volumes de reagente oxidante ou clorofórmio. Para redução de experimentos, também é possível fazer a quantificação através de uma calibração de ponto único, contanto que o ponto de referência utilizado esteja entre 20 e 90  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{I}_2$ , como demonstrado através de estudos estatísticos. O método demonstrou precisão satisfatória, onde os coeficientes de variação não ultrapassaram 6%. O método proposto apresenta resultados equivalentes aos obtidos pelo método EN 14111 com um nível de confiança de 95%.

**PRODUÇÃO CIENTÍFICA PUBLICADA**

*Dual-opposite end multiple injection method applied to sequential determination of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> ions and free and total glycerol in biodiesel by capillary zone electrophoresis*  
*Journal of Chromatography A Volume 1570, 5 october 2018, pages 148-154*  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.079>

*Fast Determination of Iodine Number of Biodiesel Using Capillary Zone Electrophoresis with Multi- and Single-Point Calibration*  
*Braz. Chem. Soc. vol.30 no.2 São Paulo Feb. 2019*  
<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20180180>

## REFERÊNCIAS

ABNT. NBR15556 Produtos derivados de óleos e gorduras - Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos - Determinação do teor de sódio, potássio, magnésio e cálcio por espectrometria de absorção atômica. 2008a.

ABNT. NBR 15554:2008 Produtos derivados de óleos e gorduras - Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos - Determinação do teor de sódio por espectrometria de absorção atômica, 2008b.

ABNT. NBR 15555:2008 Produtos derivados de óleos e gorduras - Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos - Determinação do teor de potássio por espectrometria de absorção atômica, 2008c.

ABNT. NBR15553:2015 Biodiesel - Determinação dos teores de cálcio, magnésio, sódio, fósforo e potássio por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICPOES). 2015a.

ABNT. ABNT NBR 15908:2015: Biodiesel - Determinação Do Glicerol Livre, Mono-, Di-, Triacilgliceróis E Glicerol Total Por Cromatografia Gasosa, 2015b.

ABNT. NBR 15344 Biodiesel — Determinação dos teores de glicerol total e triacilgliceróis por iodometria, 2016.

ALMEIDA, J. M. S. *et al.* A simple electroanalytical procedure for the determination of calcium in biodiesel. **Fuel**, v. 115, p. 658–665, 2014.

ÁLVAREZ-RIVERA, G.; CIFUENTES, A.; CASTRO PUYANA, M. **Chapter 16 - Electrophoretic Technique: Capillary Zone Electrophoresis**. In: SUN, D.W. B. T.-M. T. FOR F. A. 2. ed. Academic Press, 2018. p. 659–685.

AMAIS, R. S. *et al.* Determination of Ca, Mg, and Zn in biodiesel microemulsions by FAAS

using discrete nebulization. **Fuel**, v. 93, p. 167–171, 2012.

ANILANMERT, B. *et al.* Simultaneous analysis method for GHB, ketamine, norketamine, phenobarbital, thiopental, zolpidem, zopiclone and phenytoin in urine, using C18 poroshell column. **Journal of Chromatography B**, v. 1022, p. 230–241, 2016.

ANP. **RESOLUÇÃO ANP Nº 45, DE 25.8.2014 - DOU 26.8.2014.**

ANP. **Dados estatísticos.** Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/dados-estatisticos>>. Acesso em: 6 ago. 2019.

AOAC INTERNATIONAL. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements Official Methods of Analysis. **AOAC International**, p. 2–17, 2016.

APROBIO. **Brasil pode se tornar o maior produtor de biodiesel no mundo.** Disponível em <<https://aprobio.com.br/2019/01/24/brasil-pode-se-tornar-o-maior-produtor-de-biodiesel-no-mundo/>> Acesso em: 6 ago. 2019.

ARICETTI, J. *et al.* A Simple Green Method for Biodiesel Iodine Number Determination. **Journal of ASTM International**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2010.

B. LIMA, M. *et al.* Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction. **Talanta**, v. 89, p. 21–26, 30 jan. 2012.

BÁNFAI, B.; KEMÉNY, S. Estimation of bias for single-point calibration. **Journal of Chemometrics**, v. 26, n. 3–4, p. 117–124, 2012.

BECKERS, J. L.; BOČEK, P. Calibrationless quantitative analysis by indirect UV absorbance detection in capillary zone electrophoresis: The concept of the conversion factor. **Electrophoresis**, v.25, p. 338-343,2004.

BOYCE, M. Separation and Quantification of Simple Ions by Capillary Zone Electrophoresis. A Modern Undergraduate Instrumentation Laboratory. **Journal of Chemical Education**, v.

76, n. 6, p. 815, 1999.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14,n. 2, p. 557-577, 2010.

CALAND, L. B. DE; SILVEIRA, E. L. C.; TUBINO, M. Determination of sodium, potassium, calcium and magnesium cations in biodiesel by ion chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 718, p. 116–120, 2012.

CARDOSO, M. H. W. M. *et al.* Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, supl.1, p. 63-72, 2010.

CHUAH, L. F. *et al.* Optimisation and Kinetic Studies of Acid Esterification of High Free Fatty Acid Rubber Seed Oil. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 41, n. 7, p. 2515–2526, jul. 2016.

CHUAH, L. F. *et al.* A review of cleaner intensification technologies in biodiesel production. **Journal of Cleaner Production**, v. 146, p. 181–193, 2017.

CREGO, A. L.; LUISA MARINA, M. UV–Vis absorbance detection in capillary electrophoresis. In: MARINA, M. L.; ROS, A.; VALCRCEL, M. B. T.-C. A. C. **Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis**. Elsevier,. v. 45, p. 225–304, 2005.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L. *et al.* Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1, p. 33–46, 2007.

DA ROCHA, M. S. *et al.* Single point calibration for quantitative speciation of selenomethionine in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by HPLC-ICP-MS: using reliable, traceable and comparable measurements. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v.62,

n.2, p. 334-347, 2018.

DAN, D. E.; IJEOMA, O. A. Statistical analysis/methods of detecting outliers in a univariate data in a regression analysis model. **International Journal of Education and Research**, v. 1, n. 5, p. 1–24, 2013.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 4, 1998.

DE JESUS, A.; SILVA, M. M.; VALE, M. G. R. The use of microemulsion for determination of sodium and potassium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 74, n. 5, p. 1378–1384, 2008.

DE SOUZA CASTILHO, M.; STRADIOTTO, N. R. Determination of potassium ions in biodiesel using a nickel(II) hexacyanoferrate-modified electrode. **Talanta**, v. 74, n. 5, p. 1630–1634, 2008.

DOS REIS, D. V. **Guia 10 v1 Tratamento estatístico validação analítica**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/Guia+10+v1+Tratamento+estatístico+validação+analítica.pdf/0840493b-be8c-42c3-a986-6e9e22e1b825>> Acesso em: 2 ago. 2019.

DVOŘÁK, M. *et al.* The dynamics of band (peak) shape development in capillary zone electrophoresis in light of the linear theory of electromigration. **ELECTROPHORESIS**, v. 40, n. 5, p. 668–682, 1 mar. 2019.

EDSSAL, J. T.; WYMAN, J. **Biophysical Chemistry: Thermodynamics, Electrostatics, and the Biological Significance of the Properties of Matter**. Academic Press, p.716, 2014.

EM. **Brasil será maior produtor de biodiesel do mundo**. Disponível em: <[https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2019/01/23/internas\\_economia,1023631/brasil-sera-maior-produtor-de-biodiesel-do-mundo.shtml](https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2019/01/23/internas_economia,1023631/brasil-sera-maior-produtor-de-biodiesel-do-mundo.shtml)>. Acesso em: 6 ago. 2019.

ENWEREMADU, C. C.; MBARAWA, M. M. Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2205–2224, 1 dez. 2009.

FANG, N.; TING, E.; CHEN, D. D. Y. Determination of Shapes and Maximums of Analyte Peaks Based on Solute Mobilities in Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 6, p. 1708–1714, 1 mar. 2004.

FARIA, A. F.; SOUZA, M. V. N. DE; OLIVEIRA, M. A. L. DE. Validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and ofloxacin in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 389–396, 2008.

FÁVERO, L. P.; BELFIORE, P. Chapter 9 - Hypotheses Tests. In: FÁVERO, L. P.; BELFIORE, P. **Data Science for Business and Decision Making**. Academic Press, p. 199 – 248, 2019.

FEKETE, A.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Chapter 15 - Capillary electrophoresis. In: PICÓ, Y. . **Food Toxicants Analysis**. Elsevier, p. 561–597, 2007.

FERRARI, R. A.; PIGHINELLI, A. L. M. T.; PARK, K. J. Biodiesel Production and Quality. In: DOS SANTOS BERNARDES, M. A.. **Biofuel's Engineering Process Technology**. IntechOpen, p. 221-240, 2011.

GASHAW, A.; MOHAMMED, A. Production of biodiesel from waste cooking oil and factors affecting its formation: A review. **International Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 3, p. 92–98, 2014.

GASHAW, A.; TESHITA, A. Production of Biodiesel from Waste Cooking Oil and Factors Affecting its Formation: A review. **International Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 3, n. 5, p. 92–98, 2014.

GEBAUER, P.; BOČEK, P. Predicting Peak Symmetry in Capillary Zone Electrophoresis: The Concept of the Peak Shape Diagram. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 8, p. 1557–1563, 1 abr. 1997.

GONÇALVES FILHO, L. C.; MICKE, G. A. Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, n. 1–2, p. 477–480, 2007.

GRUBBS, F. E. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. **Technometrics**, v.11, n.1, p.1-21, 1969.

HARRIS, D. C. **Quantitative Chemical Analysis**. ed.7, W. H. freeman, p.1008, 2007.

HIROKAWA, T.; GOJO, T.; KISO, Y. Isotachophoretic determination of mobility and pKa by means of computer simulation: IV. Evaluation of  $m_0$  and pKa, of twenty-six amino acids and assessment of the separability. **Journal of Chromatography A**, v. 369, p. 59–81, 1986.

HOLLANDS, W. J. *et al.* Development, validation and evaluation of an analytical method for the determination of monomeric and oligomeric procyanidins in apple extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1495, p. 46–56, 2017.

IBPT. **REAL FROTA CIRCULANTE NO BRASIL É DE 65,8 MILHÕES DE VEÍCULOS, INDICA ESTUDO**. Disponível em: <<https://ibpt.com.br/noticia/2640/REAL-FROTA-CIRCULANTE-NO-BRASIL-E-DE-65-8-MILHOES-DE-VEICULOS-INDICA-ESTUDO>>. Acesso em: 6 ago. 2019.

ISAO, K.; KAZUTOSHI, K. Comparative Study of Robustness of Statistical Methods for Laboratory Proficiency Testing. **Analytical Sciences**, v. 30, n. 12, p. 1165–1168, 2014.

ISO. ISO 13528:2015 (E). **Statistical methods for use in proficiency testing**, p. 1–90, 2015.

JAROŠ, M. *et al.* Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster. **Electrophoresis**, v. 25, n. 18–19, p. 3080–3085, 2004.

KALAYASIRI, P.; JEYASHOKE, N.; KRISNANGKURA, K. Survey of seed oils for use as diesel fuels. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 4, p. 471–474, 1996.

KNOTHE, G.; RAZON, L. F. Biodiesel fuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 58, p. 36–59, 1 jan. 2017.

LAPUERTA, M.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J.; DE MORA, E. F. Correlation for the estimation of the cetane number of biodiesel fuels and implications on the iodine number. **Energy Policy**, v. 37, n. 11, p. 4337–4344, 1 nov. 2009.

LEUNG, D. Y. C.; KOO, B. C. P.; GUO, Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 250–256, 1 jan. 2006.

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

LOURENÇO, L. M.; STRADIOTTO, N. R. Determination of free glycerol in biodiesel at a platinum oxide surface using potential cycling technique. **Talanta**, v. 79, n. 1, p. 92–96, 30 jun. 2009.

LOZANO, P. *et al.* Measurement of free glycerol in biofuels. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 354, n. 3, p. 319–322, 1996.

MAKINO, A. **Rapid method for measurement of iodine value**. US pat. 4297106A, 1980.

NIELEN, M. W. F. Quantitative aspects of indirect UV detection in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 588, n. 1, p. 321–326, 1991.

OLIVIERI, A. C. Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 868, p. 10–22, 2015.

OUANJI, F. *et al.* Large-scale biodiesel production from Moroccan used frying oil. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 45, p. 21022–21029, 7 dez. 2016.

PAPETTI, A.; COLOMBO, R. 14 - High-performance capillary electrophoresis for food quality evaluation. In: ZHONG, J.; WANG, X. . **Evaluation Technologies for Food Quality**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Woodhead Publishing, p. 301–377, 2019.

PEREIRA, A. C.; ROCHA, F. R. P. Liquid–liquid microextraction in a multicommuted flow system for direct spectrophotometric determination of iodine value in biodiesel. **Analytica Chimica Acta**, v. 829, p. 28–32, 2014.

PERRETT, D. Capillary electrophoresis for food analysis: Method development. **Chromatographia**, v. 55, n. 1, p. 101, 2002.

PIOVEZAN, M. *et al.* Development of a fast capillary electrophoresis method to determine inorganic cations in biodiesel samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 673, n. 2, p. 200–205, 19 jul. 2010.

PLANK, C.; LORBEER, E. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 697, n. 1–2, p. 461–468, 1995.

POOLE, C. F. Chapter 8 - Capillary-Electromigration Separation Techniques. In: POOLE, C. F. B. T.-T. E. OF C.. **The Essence of Chromatography**. Elsevier Science, p. 619–717, 2003

RAO, T. N. Validation of Analytical Methods ch. 7. In: **Calibration and Validation of Analytical Methods**, Intechopen, p. 131-141, 2018.

RIBEIRO, M. S.; ROCHA, F. R. P. A single-phase spectrophotometric procedure for in situ analysis of free glycerol in biodiesel. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 23–26, 1 jan. 2013

SCHAEPPER, J. P.; SEPANIAK, M. J. Parameters affecting reproducibility in capillary

electrophoresis. **ELECTROPHORESIS**, v. 21, n. 7, p. 1421–1429, 1 abr. 2000.

SCHUETZNER, W.; KENNDLER, E. Electrophoresis in synthetic organic polymer capillaries: variation of electroosmotic velocity and zeta potential with pH and solvent composition. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 17, p. 1991–1995, 1 set. 1992.

SHALLAN, A.; GUIJT, R.; BREADMORE, M. Capillary Electrophoresis: Basic Principles. In: SIEGEL, J. A.; SAUKKO, P. J.; HOUCK, M. M. **Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)**. ed. 2, Waltham: Academic Press, p. 549–559, 2013.

SHAPIRO, S. S. AND W. M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**, v.52, n. 3/4, p. 591–611, 1965.

SHIMAMOTO, G. G.; TUBINO, M. Simultaneous determination of six quality parameters of biodiesel through <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and partial least squares. **Talanta**, v. 179, p. 816–821, 1 mar. 2018.

SLATER, G. W.; TESSIER, F.; KOPECKA, K. The Electroosmotic Flow (EOF). In: HUGHES, M. P.; HOETTGES, K. F. (Eds.). **Microengineering in Biotechnology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. p. 121–134.

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**, v. 133, p. 195–199, 2017.

SPUDEIT, D. A.. **Desenvolvimento e otimização de métodos rápidos para análise simultânea de glicerina (livre e total), Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> em biodiesel por eletroforese capilar**. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SPUDEIT, D. A. *et al.* Simultaneous determination of free and total glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis using multiple short-end injection. **ELECTROPHORESIS**, v. 34, n. 24, p. 3333–3340, 2013.

ŠTĚDRÝ, M.; JAROŠ, M.; GAŠ, B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes. **Journal of Chromatography A**, v. 960, n. 1, p. 187–198, 2002.

SUNDÉN, B. Chapter 2 - Electrochemistry and thermodynamics. In: SUNDÉN, B. **Hydrogen, Batteries and Fuel Cells**. Academic Press, p. 15–36, 2019.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173–181, 1995.

TAVARES, M. F. M. **Mecanismos de separação em eletroforese capilar** **Química Nova**, 1997.

TUBINO, M.; ARICETTI, J. A. A green potentiometric method for the determination of the iodine number of biodiesel. **Fuel**, v. 103, p. 1158–1163, 1 jan. 2013.

WESTON, A.; BROWN, P. R. Chapter 6 - Instrumentation for Capillary Electrophoresis. In: WESTON, A.; BROWN, P. R. B. T.-H. AND C. E. Academic Press, p. 185–213, 1997.

WUETHRICH, A.; QUIRINO, J. P. Chapter 17 - Capillary Electrophoresis as a Green Alternative Separation Technique. In: PENA-PEREIRA, F.; TOBISZEWSKI, M. B. T.-T. A. OF G. S. IN S. P. Elsevier, p. 517–532, 2017.

YOUNG, D. S. **Handbook of Regression Methods**. ed. 1, Chapman and Hall/CRC, 2018.