

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DOUTORADO EM QUÍMICA

Renata Takabayashi Sato

Desenvolvimento e otimização de métodos para determinação de ésteres metílicos e acidez em amostras de biodiesel, por técnicas cromatográfica e de eletromigração

Juiz de Fora

2018

Renata Takabayashi Sato

Desenvolvimento e otimização de métodos para determinação de ésteres metílicos e acidez em amostras de biodiesel, por técnicas cromatográfica e de eletromigração

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutora em Química.

Orientador: Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sato, Renata Takabayashi.

Desenvolvimento e otimização de métodos para determinação de ésteres metílicos e acidez em amostras de biodiesel, por técnicas cromatográfica e de eletromigração / Renata Takabayashi Sato. – 2018.

65 f.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, ICE/Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

1. Biodiesel. 2. Ésteres metílicos. 3. Acidez livre. 4. Eletroforese capilar de zona. 5. Fast GC-FID. I. Oliveira, Marcone Augusto Leal de , orient. II. Título.

À memória dos meus avós,
que são meus grandes
exemplos de vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem eu sempre confio.

Aos meus pais Mario e Regina, pelo amor e apoio incondicionais, pelos conselhos ensinamentos e compreensão.

A minha família e amigos, em especial, aos meus tios Francisco e Vanda e aos primos Wilian, Cristiane, Jhonata e Marco, pelo carinho e apoio de sempre.

Ao orientador Professor Dr. Marcone A. Leal de Oliveira, obrigada pelos ensinamentos, paciência, confiança e “sessões de terapia”!

À aluna Júlia Bruce que muito me ajudou com as análises, através da sua disponibilidade, amizade e seu “jeito descontraído e divertido de ser”!

Ao Professor Dr. Adilson David da Silva e ao discente Pedro Henrique Stroppa, do Departamento de Química da UFJF, pela colaboração e ensinamentos.

Aos discentes do GQAQ (Grupo de Química Analítica e Quimiometria), aos presentes e aos que já passaram (mas que muito ensinaram) pela parceria, paciência e momentos de alegria!

Aos Professores Dra. Fernanda Bombonato, Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos e Dr. Júlio César da Silva, do Departamento de Química da UFJF, por suas contribuições durante o processo de qualificação.

Ao Professor Dr. Keyler Borges, à discente Flávia Dutra e aos demais membros do LabSep (Laboratório de Separações), da Universidade Federal de São João Del Rei, pela hospitalidade, paciência e cooperação.

Às secretárias da Pós Graduação do Departamento de Química, Maristela Meller e Mariana Marta, pela disponibilidade.

À UFJF e Capes, pela estrutura e apoio financeiro concedidos.

RESUMO

O biodiesel tem chamado atenção, principalmente, por questões ambientais. Este biocombustível pode reduzir, em 78%, as emissões de dióxido de carbono, quando comparado ao diesel convencional; ainda apresenta propriedades lubrificantes melhores; maior ponto de combustão, tornando seu transporte e armazenamento mais seguros. Do ponto de vista químico, biodiesel é uma mistura de ésteres formada a partir da reação de transesterificação de triglicerídeos, presentes em óleos e gorduras, ou ainda, a partir da esterificação ácidos graxos extraídos de micro-organismos, com álcool de cadeia curta (geralmente metanol ou etanol), na presença de catalisador básico (NaOH e KOH), ácido (HCl e H₂SO₄) ou enzimático. Dentro deste contexto, o desenvolvimento e otimização de metodologias analíticas cada vez mais eficientes rápidas e precisas tanto para o controle de qualidade do biodiesel, quanto de suas matérias-primas tornam-se necessárias. No presente trabalho foram sintetizadas amostras de biodiesel, via catálises básica e ácida, a partir de diferentes óleos vegetais obtidos comercialmente. Para a determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos majoritários em amostras de biodiesel foi utilizado a cromatografia a gás rápida com detecção por ionização em chama, acrônimo do inglês, “Fast GC-FID”, através de uma coluna capilar contendo fase estacionária de líquido iônico, sob condições isotérmicas de temperatura. O método foi aplicado com sucesso no monitoramento de reações de transesterificação de catalisadores básicos e ácidos de óleos vegetais como soja, canola, milho, girassol e aqueles utilizados no processo de fritura. Por outro lado, a determinação de acidez em amostras de biodiesel, foi mediada através de um método desenvolvido e otimizado por eletroforese capilar, com detecção indireta no ultravioleta em 224 nm. A etapa investigativa para o preparo das amostras, a qual se configurou como crucial para o sucesso das análises foi realizada com o auxílio de um planejamento fatorial completo do tipo 3², através da variação dos fatores massa pesada e o tempo de agitação. O método por eletroforese capilar mostrou-se satisfatório, pois não houve diferenças significativas, em nível de 95%, quando comparado com a metodologia oficial, por titulação potenciométrica.

Palavras chave: Biodiesel. Ésteres metílicos. Acidez livre. Eletroforese capilar de zona. Ácidos graxos. Fast GC-FID.

ABSTRACT

Biodiesel has attracted attention mainly for environmental subjects. This biofuel might reduce carbon dioxide emissions by 78% when compared to conventional diesel and presents better lubricating properties; greater point of combustion, making its transport and storage safer. According to the chemical standpoint, biodiesel is a mixture of esters formed from the transesterification reaction of triglycerides present in oils and fats, or from the esterification of fatty acids extracted from microorganisms with short chain alcohol (usually methanol or ethanol) in the presence of a basic (NaOH and KOH), acid (HCl and H₂SO₄) or enzymatic catalysts. Within this context, the development and optimization of increasingly efficient and rapid analytical methodologies for both biodiesel quality control and its raw materials become necessary. In the present work, samples of biodiesel were synthesized, via basic and acid catalysis, from different commercially obtained vegetable oils. For the determination of major fatty acid methyl esters in biodiesel samples, fast gas chromatography with flame ionization detector, "Fast GC-FID", was used through a capillary column containing a stationary phase of ionic liquid under isothermal conditions of temperature. The method was successfully applied in the monitoring of transesterification reactions of basic catalysts and acids of vegetable oils such as soybean, canola, corn, sunflower and those used in the frying process. On the other hand, the determination of acidity in biodiesel samples was mediated through a method developed and optimized by capillary electrophoresis, with indirect ultraviolet detection at 224 nm. The investigative step for the preparation of the samples, which was configured as crucial to the success of the analyzes was carried out with the aid of a complete 3² factorial design, through the variation of the factors mass and the agitation time. The capillary electrophoresis method was satisfactory, since there were no significant differences, at the 95% level, when compared with the official methodology by potentiometric titration.

Keywords: Biodiesel. Methyl esters. Free acidity. Zone capillary electrophoresis., Fatty acids. Fast GC-FID.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de transesterificação com metanol.	18
Figura 2 - Transesterificação por catálise básica.	19
Figura 3 - Transesterificação por catálise ácida.	19
Figura 4 - Estruturas moleculares de ésteres metílicos de ácidos graxos.	21
Figura 5 - Estruturas moleculares de alguns ácidos graxos.	24
Figura 6 - Esquema de representação de cromatógrafo a gás.	25
Figura 7 - Esquema para CE. O <i>vial</i> com amostra e o de entrada, que são trocados durante as injeções.	28
Figura 8 - Migração de íons e compostos neutros, com fluxo eletrosmótico normal.	30
Figura 9 - Obtenção de biodiesel, através de reação de transesterificação, com catalisador básico.	37
Figura 10 - Separação de biodiesel obtido por catálise ácida.	38
Figura 11 - Preparo de amostra para análise em GC.	39
Figura 12 - Cromatogramas de mistura de padrões e amostras de biodiesel obtidas através da reação de transesterificação de diferentes óleos vegetais, com catalisador básico e de óleo de soja, com catalisador ácido. Condições operacionais: FID em 230 °C, temperatura da coluna em 160 °C, velocidade linear do H ₂ em 50 cm s ⁻¹ , injeção em modo <i>split</i> na razão de 1:500, coluna capilar SLB-IL 111 com 14 m de	

comprimento, 0,10 mm d.i. e 0,8 μm de espessura do filme. Picos: 1- MMe; 2- PMe; 3- EMe; 4- OMe; 5- LMe; 6- LnMe 41

Figura 13 - Porcentagens de ésteres metílicos em amostras de biodiesel e a soma das porcentagens de outros ésteres (não detectados) e resíduos (mono, di-glicerídeos, glicerol, catalisador e água)..... 42

Figura 14 - Eletroferogramas dos experimentos referentes ao planejamento fatorial 3^2 , com amostras diluídas em MeOH. Solução de eletrólito: 15,0 mmol L^{-1} tampão fosfato, 8,3 mmol L^{-1} de Brij[®] L23, 4,0 mmol L^{-1} de SDBS, 2,1% de octanol e 45% de ACN. Condições operacionais: injeção de 12,0 mbar por 4 s; tensão de + 19 kV; 25°C; capilar tipo TSH, de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm de comprimento efetivo, 75 μm d.i. e 375 μm d.e. Picos: (1) C18:1, (2) C16:0, (3) C18:2, (PI) C13:0. 45

Figura 15 - Eletroferogramas com diferentes solventes em análises de acidez livre em biodiesel. Eletrólito: 15 mmol L^{-1} de solução tampão $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH ~ 7,2), 4,0 mmol L^{-1} de SDBS, 8,3 mmol L^{-1} de Brij 35[®], 45 % v/v de ACN e 2,1 % de octanol. Picos: (1) C18:1 ; (2) C16:0; (3) C18:2; (PI) C13:0..... 46

Figura 16 - Eletroferogramas dos experimentos referentes ao planejamento fatorial 3^2 , da amostra de biodiesel produzido por catálise ácida. Solução de eletrólito: 15,0 mmol L^{-1} tampão fosfato, 8,3 mmol L^{-1} de Brij[®] L23, 4,0 mmol L^{-1} de SDBS, 2,1 % de octanol e 45 % de ACN. Condições operacionais: injeção de 12,0 mbar por 4 s; tensão de + 19 kV; 25°C; capilar tipo TSH, de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm de comprimento efetivo, 75 μm d.i. e 375 μm d.e. 47

Figura 17 - Eletroferograma para determinação de AGL em biodiesel obtido por catálise ácida. Solução de eletrólito: 15,0 mmol L^{-1} tampão fosfato, 8,3 mmol L^{-1} de Brij[®] L23, 4,0 mmol L^{-1} de SDBS, 2,1 % de octanol e 45 % de ACN. Condições operacionais: injeção de 12,0 mbar por 4 s; tensão de + 19 kV; 25 °C; capilar tipo TSH, de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm de comprimento efetivo, 75 μm d.i. e 375 μm d.e. Picos: (1) C18:1, (2) C16:0, (3) C18:2, (4) C18:3, (PI) C13:0..... 48

Figura 18 - Eletroferogramas para determinação de AGL em biodiesel obtido via catálise ácida, de acordo com o Planejamento fatorial 3^2 da Tabela 3. Solução de eletrólito: $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tampão fosfato, $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij[®] L23, $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS, 2,1 % de octanol e 45 % de ACN. Condições operacionais: injeção de 12,0 mbar por 4 s; tensão de + 19 kV; 25 °C; capilar tipo TSH, de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm de comprimento efetivo, 75 μm d.i. e 375 μm d.e. 50

Figura 19 – Eletroferogramas para os preparos de amostras de otimizados. A - biodiesel de canola; B - biodiesel de girassol; C - biodiesel de óleo de fritura, D - biodiesel obtido via catálise ácida, E - biodiesel de soja - SC, F - biodiesel de soja - GO, G - biodiesel de soja - SP,..... 51

Figura 20 – Curvas referentes a titulação potenciométrica. A – pH x volume de titulante; B – segunda derivada da curva A. 58

Figura 21 – Curvas da derivada segunda de amostras de biodiesel, por titulação potenciométrica. A – canola. B – industrial. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de ésteres metílicos nas amostras de biodiesel.....	42
Tabela 2 – Planejamento fatorial 3^2 para preparo de amostra nas análises em CZE - UV.	44
Tabela 3 – Planejamento fatorial 3^2 para preparo de amostra de biodiesel obtida via catálise ácida.....	49
Tabela 4 – Valores utilizados para os modelos de regressão.	53
Tabela 5 – Parâmetros de regressão obtidos.	54
Tabela 6 – Teores de acidez em amostras de biodiesel, por CE.....	57
Tabela 7 - Teores de acidez em amostras de biodiesel, por titulação potenciométrica. .	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

v_{ef}	Velocidade eletroforética
v_{eo}	Velocidade eletrosmótica
v_t	Velocidade total
μ_{ef}	Mobilidade eletroforética
μ_{eo}	Mobilidade eletrosmótica
μ_t	Mobilidade total
ACN	Acetonitrila
AG	Ácidos Graxos
AGL	Ácidos Graxos Livres
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
B	Difusão longitudinal
Brij® L23	Polioxoetileno 23 lauril éter
CCE	Comprimento de cadeia equivalente
C_E	Coefficiente para transferência de massa na fase estacionária
CE	Eletroforese capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
CEC	Eletrocromatografia capilar (<i>Capillary Electrochromatography</i>)
CGE	Eletroforese capilar em gel (<i>Capillary Gel Electrophoresis</i>)
CIEF	Focalização isoeletrico capilar (<i>Capillary Isoelectric Focusing</i>)
CITP	Isotacoforese capilar (<i>Capillary Isotachopheresis</i>)
C_M	Coefficiente para transferência de massa na fase móvel
CZE	Eletroforese capilar de zona (<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)

d.e.	Diâmetro externo
d.i.	Diâmetro interno
DAD	Detector por arranjo de diodos (<i>Diode Array Detector</i>)
D_E	Coefficiente de difusão na fase estacionária
d_f	Espessura do filme líquido
D_M	Coefficiente de difusão na fase móvel
d_p	Tamanho da partícula
E	Intensidade do campo elétrico
EMe	Estearato de metila
EtOH	Álcool etílico ou etanol
FID	Detector por ionização por chama (<i>Flame Ionization Detector</i>)
GC	Cromatografia a gás (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-FID	Cromatografia a gás, com detector por ionização em chama (<i>Gas Chromatography – Flame Ionization Detector</i>)
H	Altura do prato
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IsOH	Álcool isopropílico ou isopropanol
k	Fator de retenção
L	Comprimento da coluna
LMe	Linoleato de metila
LnMe	Linolenato de metila
MEKC	Cromatografia micelar eletrocinética capilar (<i>Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography</i>)

MeOH	Álcool metílico ou metanol
MMe	Misristato de metila
N _C	Número de carbonos da cadeia carbônica
N _{C-C}	Número de insaturações
NMR	Ressonância magnética nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
OMe	Oleato de metila
PI	Padrão interno
PMe	Palmitato de metila
q	Carga iônica
r	Raio
SDBS	Dodecilbenzenosulfonato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Benzenesulfonate</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1.	TRANSESTERIFICAÇÃO	18
1.2.	ANÁLISE DE ÉSTERES EM BIODIESEL	20
1.3.	DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM BIODIESEL	22
1.4.	CROMATOGRAFIA A GÁS: CONSIDERAÇÕES GERAIS	24
1.4.1.	Cromatografia à Gás Rápida (Fast GC)	26
1.5.	TÉCNICAS DE ELETROMIGRAÇÃO: CONSIDREÇÕES GERAIS	27
1.5.1.	Eletroforese Capilar de Zona	31
2.	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVOS GERAIS	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3.	EXPERIMENTAL	34
3.1.	MATERIAIS E REAGENTES	34
3.2.	INSTRUMENTAÇÃO	35
3.2.1.	Cromatógrafo à Gás	35
3.2.2.	Sistema de Eletroforese Capilar	35
3.3.	AMOSTRAS.....	36
3.3.1.	Sínteses de biodiesel	36
3.3.1.1.	<i>Catálise Básica</i>	36
3.3.1.2.	<i>Catálise Ácida</i>	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1.	DETERMINAÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS, POR FAST GC - FID.....	39
4.1.1.	Preparo das amostras	39
4.2.	DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM BIODIESEL, POR CZE - UV.....	43
4.2.1.	Preparo das amostras	43
4.2.2.	Preparo da amostra de biodiesel sintetizado via catálise ácida	47
4.3.	QUANTIFICAÇÃO	52
4.3.1.	Curva Analítica	52
4.3.2.	Limites de Detecção e Quantificação	55
4.3.3.	Determinação da acidez	56
4.3.4.	Comparação entre titulação potenciométrica e CZE - UV	57
5.	CONCLUSÕES	60

REFERÊNCIAS	61
--------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

No final dos anos de 1890, o engenheiro mecânico alemão Rudolf Christian Karl Diesel (1858 – 1913) apresentou um motor, com boa eficiência termodinâmica, movido a óleo mineral e que mais tarde, foi testado e bem sucedido com óleo vegetal, pela Companhia Otto, em Paris (Knothe et al., 2010).

Com a eclosão da Segunda Guerra Mundial, muitos governos sentiram-se inseguros com o suprimento de derivados de petróleo e passaram a utilizar óleos vegetais como combustíveis de emergência. O Brasil, por exemplo, proibiu a exportação de óleo de algodão para forçar a queda do preço no mercado interno e utilizá-lo como combustível em locomotivas (Guerra e Fuchs, 2010; Knothe et al., 2010). Entretanto, pós-guerra, os combustíveis derivados de petróleo, como o óleo diesel, apresentaram-se mais baratos e abundantes no mercado, tornando-se a principal fonte de combustível para motores, até os dias atuais (Dib, 2010).

No entanto, com as crises de petróleo da década de 70, em virtude de aumentos no preço e outras dificuldades iminentes à comercialização do produto, sinalizou que a oferta de petróleo não é garantida. Além disso, em função da crescente conscientização ambiental em associação com as políticas públicas mundiais em prol da mitigação de fontes poluentes no intuito de prevenção do planeta, torna-se necessário o desenvolvimento de combustíveis provenientes de fontes renováveis. Uma boa alternativa seria o uso de óleos vegetais, porém, o uso direto desses é restrito, devido à sua alta viscosidade e baixa volatilidade, resultando em pobre “atomização” (formação de gotículas), combustão incompleta, deposição de carbono no injetor de motores, queima e solidificação de material lubrificante (Ma e Hanna, 1999; Monteiro et al., 2008).

A redução da viscosidade de óleos vegetais para uso como biocombustível, em motores de combustão interna, pode ser realizada através de diluição com diesel derivado de petróleo, microemulsificação com álcoois, decomposição térmica (pirólise) ou, ainda, por uma reação de transesterificação com metanol (MeOH) ou etanol (EtOH) (Ma e Hanna, 1999; Knothe et al., 2010). Entre estas, a transesterificação tem sido a alternativa mais utilizada. Os produtos da reação de transesterificação são glicerol e ésteres de ácidos graxos conhecidos como biodiesel, que apresentam características

físicas semelhantes às do óleo diesel e podem ser utilizados em motores do ciclo diesel sem nenhuma modificação (De Paula et al., 2011).

Segundo a lei brasileira nº 11.097, biodiesel é *“biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil. (NR)”* (Brasil, 2005). Este biocombustível pode ser utilizado puro, ou ainda, em misturas com diesel de origem fóssil. A nomenclatura para tais misturas é do tipo BX, onde X corresponde à porcentagem de biodiesel na amostra, isto é, B5 significa a presença de 5% de biodiesel e 95% de combustível fóssil. Atualmente, no Brasil, é obrigatória a porção de 10% de biodiesel nos tanques de diesel (Brasil, 2016; 2018).

O biodiesel pode reduzir em 78%, as emissões de dióxido de carbono, quando comparado ao diesel convencional; ainda apresenta propriedades lubrificantes melhores; maior ponto de combustão (entre 100 – 170 °C), tornando seu transporte e armazenamento mais seguros; não há necessidade de perfurações e refinamentos e menor dependência de importação. Além disso, o biodiesel pode ser produzido através de óleos residuais de fritura, que muitas vezes, são descartados incorretamente (Xue et al., 2011; Atabani et al., 2012).

Por outro lado, alguns problemas associados ao uso de biodiesel são seu preço elevado; apresenta 12% de redução de energia, o que eleva entre 2 – 10% o consumo de combustível; pode causar deposição excessiva de carbono em motores, resultando em falhas do mesmo; possui menor estabilidade oxidativa, maiores emissão de óxidos de nitrogênio, ponto de névoa (temperatura em que o combustível inicia sua cristalização) e viscosidade. O uso do biodiesel ainda gera algumas questões como: a grande quantidade de água utilizada no processo de lavagem, formação de sabão e a preocupação quanto aos problemas econômicos, pois como a maior parte de sua produção provém de óleos vegetais comestíveis, alguns estudiosos defendem a ideia de um possível desequilíbrio quanto ao fornecimento de alimentos (Atabani et al., 2012). Este último poderá ser solucionado pela crescente pesquisa quanto ao uso de micro-organismos, como algas, bactérias e fungos, e suas extrações lipídicas para produção de biodiesel (Atabani et al., 2012, Christophe et al., 2012; Cho e Park, 2018).

Para a obtenção de biocombustível, com qualidade competitiva, deve-se considerar algumas características técnicas: a reação de transesterificação precisa ser completa, acarretando ausência total de ácidos graxos (AG) remanescentes e os ésteres devem ser de alta pureza, contendo pequenos traços de glicerina, catalisador residual ou

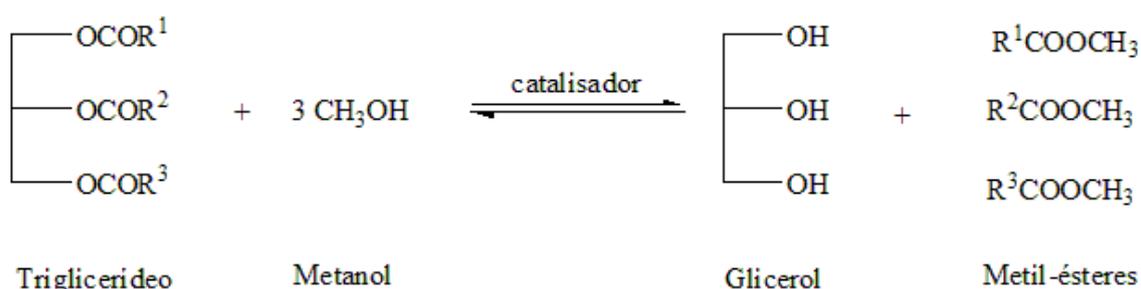
álcool (De Paula et al., 2011). A purificação do biodiesel, empregando-se lavagem com água apresenta desvantagens, no entanto, é o método mais utilizado devido à carência de alternativas viáveis. No processo são utilizadas grandes quantidades de água, o que pode originar a formação de emulsões estáveis. A água, além de promover a hidrólise de ésteres, resultando em ácidos graxos livres (AGL), está associada à proliferação de micro-organismos, corrosão em tanques de estocagem com deposição e sedimentos (De Paula et al., 2011).

1.1. TRANSESTERIFICAÇÃO

O primeiro relato do que se conhece, hoje, como biodiesel foi a patente belga BE 422.877, de 1937, depositada por Charles George Chavanne, que descreve o uso de ésteres etílicos obtidos através da reação de transesterificação, por catálise ácida, de óleo de palma, como combustível para motores a diesel (Chavanne, 1937; Knothe et al., 2010).

Assim, um dos métodos mais utilizados para obtenção do biodiesel é através de uma reação de transesterificação (Figura 1) de triacilglicerídeos (presentes em óleos vegetais e gorduras), com álcool de cadeia curta, geralmente MeOH ou EtOH, na presença de catalisador básico (base forte), ácido (ácido forte) ou enzimático (Ferrari et al., 2005).

Figura 1 - Reação de transesterificação com metanol.

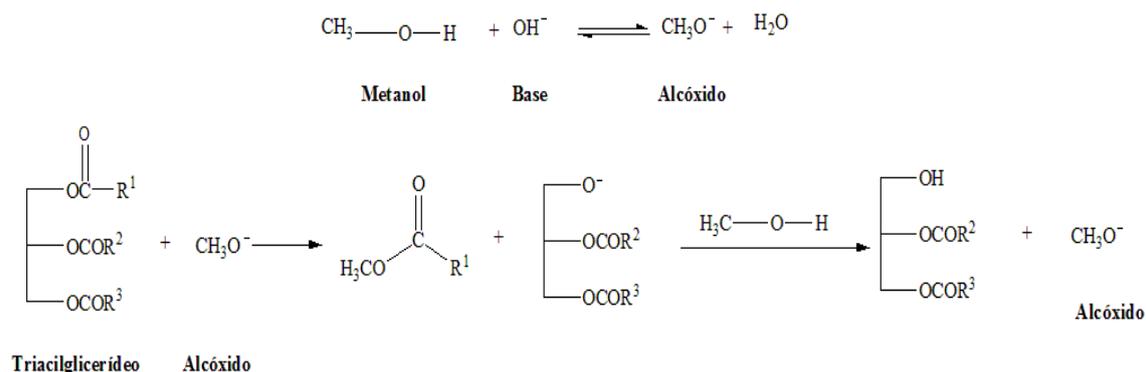


Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Os catalisadores básicos são os mais utilizados, pois os processos são mais rápidos e as condições das reações são mais moderadas (Figura 2). Entretanto, sua

utilização nas reações de transesterificação de óleos vegetais, produz sabão pela neutralização de AG e pela saponificação de triglicerídeos. A formação de sabão é indesejável, pois além de diminuir o rendimento do biodiesel, dificulta os processos de separação e purificação.

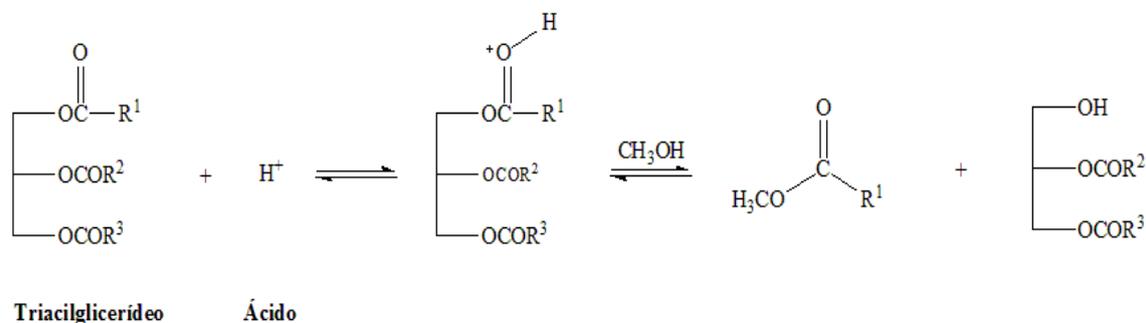
Figura 2 - Transesterificação por catálise básica.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

As matérias-primas com maior índice de acidez, como gordura animal e óleos usados em processos de fritura, seriam melhores transesterificadas com catalisador ácido (Figura 3), Apesar da cinética lenta, a catálise ácida favorece que os AGL da matéria prima sejam convertidos em ésteres, aumentando o rendimento da reação, ao contrário da catálise alcalina (Portela, 2011).

Figura 3 - Transesterificação por catálise ácida.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

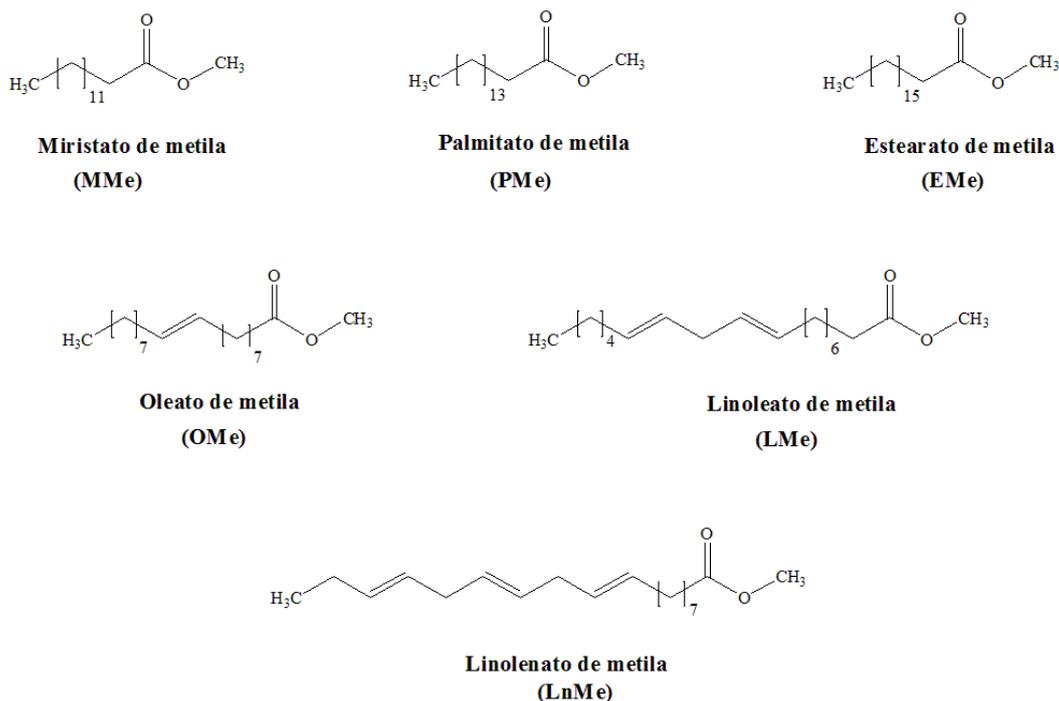
1.2. ANÁLISE DE ÉSTERES EM BIODIESEL

No Brasil, o teor de ésteres em biodiesel é previsto pela Resolução da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) nº 14, de 2012, cuja porcentagem mínima de éster é de 96,5% em massa, a ser determinada pelo método ABNT NBR 15764, indicando a cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID, *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*) com padronização interna e quantificação por um ponto (Brasil, 2012).

Diversas técnicas têm sido estudadas para a determinação do teor de ésteres em biodiesel para estimar a pureza do produto final e para acompanhar a reação de transesterificação, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance* - ^1H e ^{13}C), infravermelho próximo (NIR, *Near Infrared*) (Lôbo e Ferreira, 2009) e eletrocromatografia capilar (CEC, *Capillary Electrochromatography*) (Chylińska-Ptak *et al.*, 2004).

A identificação individual dos ésteres de ácidos graxos (Figura 4) também pode ser importante, pois suas características estruturais, como tamanho da cadeia carbônica, grau de insaturação e grupos substituintes na cadeia, influenciam as propriedades do combustível.

Figura 4 - Estruturas moleculares de ésteres metílicos de ácidos graxos.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Trabalhos que compararam diesel de petróleo e biodiesel mostraram que amostras com ésteres saturados de cadeia longa emitem menos óxidos de nitrogênio (NO_x), enquanto que ésteres insaturados mostraram emissões maiores, de 6-12%. (McCormick et al., 2001; Knothe et al., 2006; Refaat, 2009). Observaram-se, também, menores emissões de hidrocarbonetos, monóxido de carbono e materiais particulados (fuligem, frações orgânicas solúveis e sulfato), com reduções nas faixas de 16-50%, 24-49% e 73-88%, respectivamente (Knothe et al., 2006).

Outras propriedades como viscosidade, densidade e índice de cetano também podem ser influenciadas pelas características estruturais dos ésteres: a viscosidade aumenta com os aumentos da cadeia carbônica e grau de insaturação, e diminui, com a presença da configuração cis, quando comparado a configuração trans; já a densidade, aumenta com a diminuição da cadeia carbônica e com o aumento do grau de insaturação; o índice de cetano (tempo de ignição) diminui com a diminuição da cadeia carbônica e com os aumentos do grau de insaturação e grupos substituintes (McCormick et al., 2001; Refaat, 2009).

Assim, o desenvolvimento de métodos rápidos, tanto para medidas do teor de ésteres, quanto para a identificação individual dos mesmos, torna-se importante para o controle de qualidade do biodiesel.

1.3. DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM BIODIESEL

Um dos parâmetros de qualidade mais críticos do biodiesel é o teor de acidez que, segundo a ANP, não deve ultrapassar o valor de 0,5 mg de hidróxido de potássio (KOH) por 1 g de amostra (Brasil, 2014), que, segundo Mahajan e colaboradores, corresponde em 0,25% em massa de AG (Mahajan et al., 2006).

O teor de acidez em biodiesel é devido ao teor de AGL, que se formam através da hidrólise dos ésteres, tanto durante a produção, quanto na estocagem do produto (Mahajan et al., 2006; Knothe et al., 2010). Um alto índice de acidez pode indicar que a produção não foi realizada de maneira correta e ainda, é um indicador da presença de água no combustível podendo causar corrosões, depósitos no motor e entupimentos de bicos injetores (Mahajan et al., 2006).

A maioria dos métodos para determinação de acidez é realizada por titulação volumétrica, com soluções de base padronizadas, e ponto final determinado pela mudança de coloração do indicador. No Brasil, a determinação da acidez para biodiesel é baseada no método ASTM D 664 (Brasil, 2014), que é o mesmo para combustíveis derivados de petróleo, e recomenda a titulação potenciométrica (Astm, 2004b), o que pode ser o mais aconselhável, já que algumas amostras de biodiesel podem apresentar coloração amarela mais intensa, dificultando a visualização do ponto final.

Apesar de soluções aquosas funcionarem bem para análises de óleos e combustíveis (Mahajan et al., 2006; Tubino e Aricetti, 2011; Aricetti e Tubino, 2012; Sato et al., 2014), há a possibilidade da hidrólise de ésteres por soluções aquosas, influenciando no consumo de titulante.

Assim, a determinação de acidez para combustíveis consiste na titulação potenciométrica de solução contendo de 0,1 a 20 g de amostra e 125 mL de isopropanol (IsOH)/clorofórmio (1:1), sendo este último, com a possibilidade de substituição por tolueno, e solução alcoólica de KOH, utilizada como titulante (Astm, 2004b). Além das altas quantidades de solventes e toxicidade, o eletrodo requer procedimento mais cuidadoso de limpeza entre as titulações.

Alguns trabalhos propuseram outros métodos, todos baseados em titulação, para determinação de acidez em biodiesel. Mahajan et al utilizaram o método baseado na ASTM D 974, que consistiu na titulação colorimétrica não aquosa de solução contendo 20 g de amostra e 100 mL de mistura de IsOH, tolueno e pequena quantidade

de água, com solução de KOH em IsOH e n-naftolbenzeno como indicador, que segundo os autores, há a alteração da cor alaranjada para verde, mesmo em soluções com amostras coloridas (Astm, 2004a; Mahajan et al., 2006). As análises foram realizadas por quatro analistas em três laboratórios diferentes, obtendo boa reprodutibilidade.

Tubino e Aricetti publicaram trabalhos utilizando a solução de água/etanol (1:1) para solubilizar a amostra e solução aquosa de base, a fim de diminuir a quantidade de resíduos tóxicos resultante da titulação. Em 2011 (Tubino e Aricetti, 2011), foi proposta a titulação potenciométrica de biodiesel e em 2012 (Aricetti e Tubino, 2012) foi realizada a titulação colorimétrica, com fenolftaleína como indicador. Embora ambos os trabalhos apresentem boas precisão e exatidão, quando comparados ao método da ASTM D 974, ainda há o uso de grande quantidade de amostra (20 g) e, apesar da menor toxicidade, uma quantidade relativamente alta de solvente (75 mL) composto por uma parte de água, que pode contribuir para a degradação da amostra.

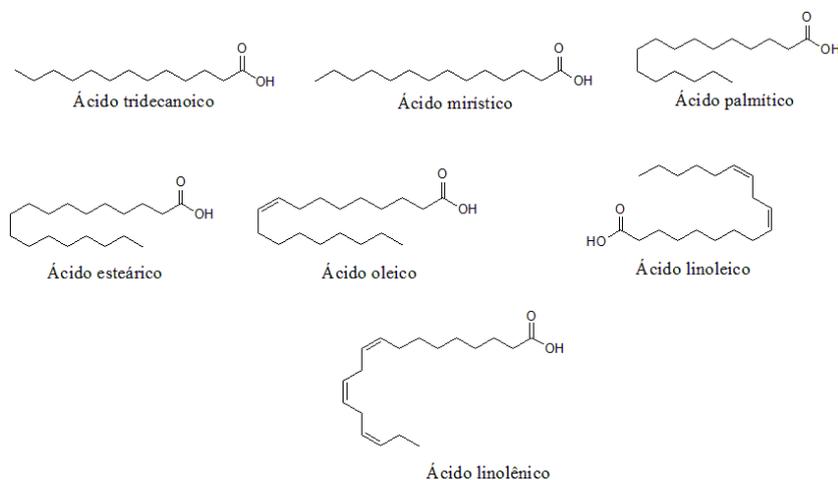
Baig et al propuseram a titulação potenciométrica, com titulador automático, de 2 g de amostra e 125 mL de solução tolueno/IsOH/água (100:99:1), porém, provavelmente, devido à alta razão solvente/amostra, não foi obtida boa exatidão (Baig et al., 2013). Assim, com o intuito de obter melhores resultados, associado com a diminuição de resíduos tóxicos, foi proposta a titulação potenciométrica com 2 g de amostra e 10 mL da mistura de solventes, resultando em boas precisão e exatidão. (Baig et al., 2013).

Diante desse contexto, ainda há espaço considerável para o desenvolvimento de métodos confiáveis, de baixo custo, automatizados e que adote o propósito da “Química Verde” - aplicação de técnicas ou metodologias que eliminem ou reduzem a geração de resíduos e o uso de reagentes e solventes menos tóxicos para a saúde humana e meio ambiente (Koel e Kaljurand, 2006) – para determinação do teor de acidez em biodiesel.

Como citado anteriormente, o teor de acidez em biodiesel se dá pela formação de AGL no produto; e uma técnica já bem estabelecida para a análise de AG (Figura 5) é a eletroforese capilar (CE, *Capillary Electrophoresis*), que utiliza menores quantidades de amostra e solventes (Buchberger e Winna, 1996; Balesteros et al., 2007; Porto et al., 2011; Barra et al., 2012; Oliveira et al., 2014; Sato et al., 2014; Castro et al., 2015), quando comparado à cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC, *High*

Performance Liquid Chromatography), por exemplo (Harris, 2005; Skoog, D. A. et al., 2009).

Figura 5 - Estruturas moleculares de alguns ácidos graxos.

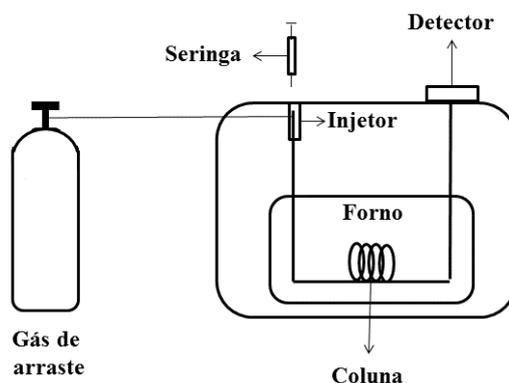


Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

1.4. CROMATOGRAFIA A GÁS: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em métodos por cromatografia a gás (GC, *Gas Chromatography*) a amostra, gasosa ou líquida, é vaporizada e injetada em uma das extremidades de uma coluna cromatográfica. Ao contrário da maioria dos métodos cromatográficos, a fase móvel (gás inerte) não interage com as moléculas do analito. Assim, o composto vaporizado é arrastado através da coluna por meio do gás de arraste. Os analitos separados na coluna cromatográfica cruzam o detector e o cromatograma é registrado por um processador de dados. A coluna deve ser aquecida para proporcionar uma pressão de vapor que possibilite a eluição de todos os analitos em tempo razoável (Skoog, D. A. et al., 2009). Um esquema para instrumentação em GC é representada na Figura 6.

Figura 6 - Esquema de representação de cromatógrafo a gás.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Nem toda amostra pode ser analisada diretamente por GC. Para se moverem ao longo da coluna, os constituintes da amostra devem ser voláteis. Solutos de baixa volatilidade podem ficar retidos na coluna e eluírem durante análises subsequentes, enquanto que solutos não voláteis podem condensar no corpo do injetor ou dentro da coluna, degradando-a (Harvey, 2000). Assim, para análise de compostos não voláteis ou pouco voláteis, usualmente, faz-se uma etapa de derivatização, ou seja, os analitos de interesse são quimicamente convertidos a derivados voláteis. Alguns exemplos são aminoácidos e AG, que por apresentarem baixa volatilidade, são convertidos em ésteres (Harvey, 2000; Oliveira et al., 2014).

O detector ideal em GC deve apresentar uma resposta linear quanto a variações de concentrações e não apresentar sensibilidade devido a alterações no fluxo ou temperatura (Harvey, 2000). Dentre os detectores mais utilizados, está o detector por ionização por chama (FID, *Flame Ionization Detector*), que pode ser considerado como detector universal de compostos orgânicos (Harvey, 2000). O FID funciona com a combustão dos compostos, resultando em uma chama rica em íons e elétrons. Assim, quando um potencial elétrico é aplicado nas proximidades da chama, uma pequena corrente é gerada e, quando amplificada, proporciona o sinal analítico (Augusto, 2000; Harvey, 2000).

Outro parâmetro importante em GC é a fase estacionária da coluna. A ordem de eluição dos analitos é determinada, principalmente, pelo ponto de ebulição dos analitos. Entretanto, analitos com pontos de ebulição próximos, serão separados pela diferença de interação com a fase estacionária. As fases estacionárias devem ser

quimicamente inertes, termicamente estáveis e de baixa volatilidade. Um problema que fases estacionárias líquidas podem apresentar é o “sangramento” da coluna: as colunas possuem limites de temperatura e quando operadas acima deste limite, o tempo de vida da coluna diminui significativamente (Harvey, 2000).

Uma das fases estacionárias líquidas que tem chamado atenção é a de líquido iônico (Ragonese et al., 2009; Delmonte et al., 2011). Os líquidos iônicos são uma classe de solvente com baixo ponto de fusão, geralmente formados por um cátion orgânico e um ânion orgânico ou inorgânico e que possuem baixa volatilidade e alta estabilidade térmica, tornando-se atrativos para uma fase estacionária em colunas de GC (Anderson e Armstrong, 2003). Capilares com fases estacionárias de líquido iônico, de diferentes polaridades, têm sido lançadas comercialmente e são bem sucedidas em separações tanto de compostos apolares quanto polares, destacando-se isômeros geométricos e de posição de ésteres metílicos de AG (Ragonese et al., 2009; Delmonte et al., 2011).

1.4.1. Cromatografia à Gás Rápida (*Fast GC*)

O *Fast GC* é utilizado com a promessa da redução dos tempos de retenção (t_r), utilizando uma coluna de menor comprimento (L) e gás com maior velocidade linear (u) (Equação 1), em comparação com análises por GC convencional (Matisová e Dömötöröová, 2003).

$$t_r = \frac{L(k+1)}{u} \quad (1)$$

Uma outra maneira de reduzir o t_r é reduzir o valor de k (fator de retenção), que pode ser alterado ajustando-se a temperatura da coluna ou selecionando uma diferente fase estacionária (ou a combinação de ambos), e ainda realizando uma análise isotérmica (Maštovská e Lehotay, 2003).

Entretanto, estas características podem reduzir a eficiência do método, o que pode ser evitado, ou ao menos minimizado, utilizando capilares com menor espessura de filme ou aumentando a difusão do soluto, com o uso de H_2 ao invés de He como gás

de arraste (Mařtovská e Lehotay, 2003). A relaçaõ entre estes parâmetros pode ser observada através da Equaçã de Golay (Equaçã 2).

$$H = \frac{B}{u} + (C_E + C_M)u = \frac{2\gamma D_M}{u} + \frac{f_E k d_f^2}{D_E} u + \frac{f_M k d_p^2}{D_M} u \quad (2)$$

Onde H é altura do prato, u é a velocidade linear da fase móvel, B está relacionado à difusã longitudinal, C_E e C_M sã coeficientes relacionados à transferêcia de massa na fase estacionária líquida e na fase móvel, respectivamente. Estes coeficientes podem ser desdobrados e γ é uma constante dependente da fase estacionária; D_M é o coeficiente de difusã na fase móvel; D_E é o coeficiente de difusã na fase estacionária; k é o fator de retençaõ; d_f a espessura do filme líquido que recobre a fase estacionária e d_p , o tamanho da partícula (Skoog, D. A. et al., 2009).

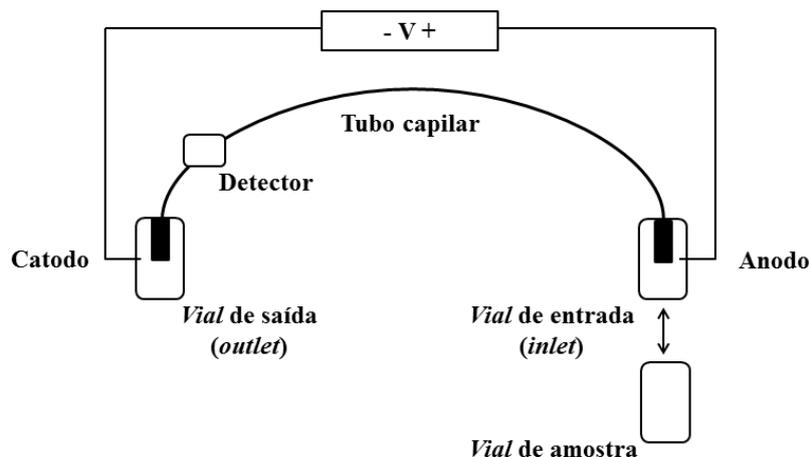
As análises por *Fast GC* podem ser realizadas nos modernos equipamentos de GC, que permitem rápidas injeções e programações de temperatura e pressãõ (Mařtovská e Lehotay, 2003).

1.5. TÉCNICAS DE ELETROMIGRAÇÃO: CONSIDREÇÕES GERAIS

A CE é uma técnica de analítica fundamentada nos princípios de eletromigraçaõ, cujo princípio de separaçã baseado na migraçaõ diferenciada de compostos neutros, íons solvatados e espécies ionizáveis em um meio líquido condutor, sob a influêcia de campo elétrico (Baker, 1995; Tavares, 1996; Oliveira et al., 2014).

A instrumentaçãõ em CE consiste de fonte de energia para aplicaçaõ de potencial elétrico, compartimentos de anodo e catodo, contendo reservatórios de soluçaõ tampãõ, *vial* com amostra, tubo capilar e um detector (Figura 8).

Figura 7 - Esquema para CE. O *vial* com amostra e o de entrada, que são trocados durante as injeções.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

A separação é conduzida em tubos capilares, geralmente de sílica fundida com recobrimento externo polimérico, preenchidos com solução de eletrólito ou solução tampão. A alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados, resultando em separações de alta eficiência, tempos, relativamente, curtos e, além disso, a CE permite pequena demanda de amostras e solventes (Tavares, 1997). A amostra é introduzida em uma das extremidades do capilar e um potencial de corrente contínua é aplicado entre os dois eletrodos durante a separação. Os analitos separados são monitorados por um detector posicionado na extremidade oposta à injeção da amostra (Skoog, D. A. et al., 2009).

Os componentes da amostra migram devido a dois tipos de mecanismo: mobilidade eletroforética, que é a resposta do soluto ao potencial elétrico e a mobilidade devido ao fluxo eletrosmótico que ocorre devido a eletrosmose, característica inerente ao capilar de sílica fundida ao ser preenchido com solução de eletrólito, em resposta ao potencial elétrico aplicado (Harvey, 2000).

A velocidade eletroforética, v_{ef} , de um íon (cm s^{-1}) em um campo elétrico pode ser definida pela Equação 3, onde E (V cm^{-1}) é a intensidade do campo elétrico e μ_{ef} ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) é a mobilidade eletroforética (Baker, 1995).

$$v_{ef} = \mu_{ef} E \quad (3)$$

A mobilidade eletroforética é definida pela Equação 4, onde q é a carga iônica do analito, η é a viscosidade da solução tampão e r , o raio do soluto (Skoog, D. A. et al., 2009).

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

Assim, as separações estão baseadas nas diferenças das relações carga-tamanho dos analitos presentes na amostra: em função da carga, a μ_{ef} de cátions será positiva, a de ânions será negativa e a de compostos neutros será nula (Harvey, 2000; Skoog, D. A. et al., 2009).

Já a velocidade eletrosmótica v_{eo} (Equação 5) é em função da magnitude do potencial elétrico E aplicado e da mobilidade eletrosmótica, μ_{eo} da solução de eletrólito ou tampão (Harvey, 2000).

$$v_{eo} = \mu_{eo} E \quad (5)$$

A mobilidade eletrosmótica, μ_{eo} , é definida pela Equação 6, onde ε é a constante dielétrica da solução tampão, ξ é o potencial zeta (diretamente proporcional à carga nas paredes do capilar) e η é a viscosidade da solução tampão.

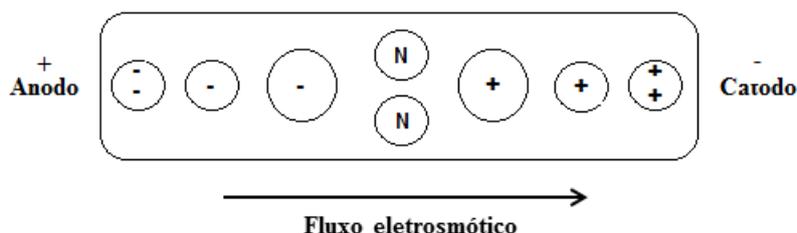
$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \xi}{4\pi\eta} \quad (6)$$

A velocidade total, v_t , do soluto é dada pela soma das velocidades eletrosmótica e eletroforética, conseqüentemente, a mobilidade total, μ_t , é dada pela soma das mobilidades.

Em condições normais tem-se: $(v_t)_{\text{cátions}} > v_{eo}$, $(v_t)_{\text{ânions}} < v_{eo}$ e $(v_t)_{\text{neutros}} = 0$. Portanto, como mostra a Figura 8, cátions migram primeiro, na ordem correspondente às suas mobilidades eletroforéticas, com cátions de menor tamanho e maior carga antes dos de maior tamanho e menor carga. Espécies neutras migram em uma única banda, com migração correspondente a velocidade do fluxo eletrosmótico e, finalmente, ânions

são os últimos componentes, com os de maior carga e menor tamanho, com maior tempo de migração (Baker, 1995; Harvey, 2000).

Figura 8 - Migração de íons e compostos neutros, com fluxo eletrosmótico normal.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Os pequenos diâmetro interno (25-75 μm) e espessura da parede dos capilares, utilizados em CE, são parâmetros muito importantes. Quando o potencial elétrico é aplicado ao capilar contendo um meio condutor, uma corrente é gerada. Esta corrente causa aquecimento devido à dissipação por efeito Joule, cuja extensão é proporcional ao raio do capilar e a magnitude do potencial elétrico. O aquecimento por efeito Joule proporciona mudança na viscosidade da solução tampão, resultando em menor viscosidade no centro do capilar e maior na proximidade da parede. Como a mobilidade eletroforética do soluto depende da viscosidade, solutos no centro irão migrar mais rapidamente que os próximos a parede, resultando no alargamento de banda (Baker, 1995).

Entre os detectores mais utilizados em CE, está o ultravioleta/visível (UV/vis). A luz incidente da lâmpada atravessa o capilar na janela de detecção, ocorrendo a absorção de parte da radiação pelo analito. A parte da radiação que não absorveu, ou seja, a parte transmitida é detectada por um fotodetector, geralmente, um fotodiodo (Baker, 1995). O princípio da detecção por UV/vis é baseada na Lei de Beer, onde a absorbância é proporcional à concentração do analito na amostra.

Para compostos que possuem baixa absorvidade, é possível utilizar a detecção indireta. Nesta abordagem, um cromóforo iônico é adicionado à solução de eletrólito, de maneira que o detector registra um sinal alto e constante devido à presença dessa substância. Quando os analitos, separados, cruzam a janela de detecção, o sinal do detector registra um decréscimo de sinal em função do decréscimo momentâneo da absorbância, resultando em picos negativos (Skoog, D. A. et al., 2009).

Entre os modos mais utilizados por CE destacam-se a eletroforese capilar de zona (CZE, *Capillary Zone Electrophoresis*), cromatografia micelar eletrocínética capilar (MEKC, *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*), focalização isoelétrica capilar (CIEF, *Capillary Isoelectric Focusing*), isotacoforese capilar (CITP, *Capillary Isotachopheresis*) e eletroforese capilar em gel (CGE, *Capillary Gel Electrophoresis*) (Baker, 1995; Tavares, 1996; Skoog, D. A. et al., 2009). Contudo, no presente trabalho será utilizado o método por CZE.

1.5.1. Eletroforese Capilar de Zona

Em CZE, o capilar é preenchido com solução tampão de composição constante, onde dois pequenos reservatórios (*vials*) também são preenchidos com a mesma solução tampão para o estabelecimento do campo elétrico.

No presente trabalho, ocorre a separação de ânions de AG de cadeia longa de mesma carga, portanto, se considerarmos a forma esférica para estes ânions, quanto menor o tamanho da cadeia carbônica, maior o tempo de migração, uma vez que a análise ocorre em contra fluxo (vetor velocidade eletrosmótica e eletroforética estão na mesma direção, porém em sentidos contrários).

Entretanto, em CZE, para a separação de AG saturados e insaturados, a definição da ordem de eluição pode ser confundida, pois as insaturações modificam o tamanho da cadeia carbônica. Apesar disso, é possível prever a ordem de eluição através do cálculo do comprimento de cadeia equivalente (CCE) (Equação 7).

$$CCE = N_C - 2N_{C-C} \quad (7)$$

Onde N_C é o número de carbono da cadeia carbônica e N_{C-C} é o número de insaturações.

Deste modo, é possível prever a ordem de eluição na separação que envolve os AG palmítico (C16:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3), por exemplo. O C16:0, apresenta dezesseis carbonos e nenhuma insaturação (CCE = 16); o C18:1 apresenta dezoito carbonos e uma insaturação (CCE = 16), C18:2, dezoito carbonos e duas insaturações (CCE = 14) e C18:3 possui dezoito carbonos e três

insaturações (CCE = 12), portanto, C16:0 e C18:1, eluem próximos, pois possuem o mesmo valor de CCE, enquanto o C18:3 possui maior tempo de migração.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- O desenvolvimento e otimização de métodos para determinação de ésteres metílicos por cromatografia a gás e acidez por eletroforese capilar em amostras de biodiesel.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento e otimização de método para determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos, por Fast GC-FID, em amostras de biodiesel.
- Desenvolvimento e otimização de método por CZE-UV para análise de acidez em amostras de biodiesel, mediante a determinação de ácidos graxos livres.
- Estudo comparativo dos resultados obtidos por CZE-UV e o método oficial por titulação potenciométrica para a determinação de acidez em biodiesel.

3. EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS E REAGENTES

Para as sínteses das amostras de biodiesel, foram utilizados óleos de soja, dos estados de São Paulo (SP), Goiás (GO) e Santa Catarina (SC), girassol, milho e canola, obtidos comercialmente, óleo residual de fritura obtido através de doações. Também foi obtida uma amostra de biodiesel, produzida industrialmente.

Foram utilizados água purificada por sistema de osmose reversa, MeOH 99,8 %, EtOH 99,8 %, ácido clorídrico 37% (HCl), KOH 85 % e sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) adquiridos de Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); acetonitrila 99,8 % (ACN) (Merck, Rio de Janeiro, Brasil), 1-octanol (Merck, Rio de Janeiro Brasil), hexano, polioxoetileno 23 lauril éter (Brij[®] L23) e dodecilbenzenosulfonato de sódio (SDBS) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto de sódio (NaCl) foram obtidos de Synth (São Paulo, Brasil) e IsOH 99,5 % de Dinâmica Química Contemporânea (São Paulo, Brasil).

Os padrões dos ácidos tridecanoico (C13:0), palmítico (C16:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolênico (C18:3) e dos ésteres miristato de metila (MMe), palmitato de metila (PMe), estearato de metila (EMe), oleato de metila (OMe) e linoleato de metila (LMe) foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Soluções estoques individuais dos AG foram preparadas em metanol na concentração de $\approx 30,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e soluções individuais de ésteres metílicos foram preparadas em hexano na concentração de $30,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Todas as soluções foram estocadas sob refrigeração de -15 a -10°C , até o momento das análises. Mistura dos padrões foram preparadas no dia da injeção a partir da diluição adequada dos estoques.

A solução estoque de Brij[®] L23 foi preparada na concentração de $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e mantida sob refrigeração de 5 a 8°C para evitar a proliferação de fungos. Para a solução estoque aquosa de SDBS, foi pesada e dissolvida a massa correspondente a $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em um balão volumétrico de $100,0 \text{ mL}$.

A solução tampão estoque (pH $\sim 7,2$) na concentração de $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada a partir da solução de fosfato monobásico de sódio (NaH₂PO₄) $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato dibásico de sódio (Na₂HPO₄), que também foi mantida sob refrigeração de 5 a 8°C .

3.2. INSTRUMENTAÇÃO

3.2.1. Cromatógrafo à Gás

Os experimentos foram realizados no equipamento GC 2010-Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com injetor do tipo *split-splitless*, autoinjeter AOC 20-i e FID, disponível nas dependências do Departamento de Química da UFJF. A aquisição dos dados foi registrada através do *software* GC Solution (Shimadzu, Kyoto, Japão). As análises foram realizadas através do capilar com fase estacionária de líquido iônico [1,5-di(2,3-dimetilimidazolio)pentanobis(trifluorometilsulfonil)imida] SLB-IL111 (Supelco, Bellefonte, PA, EUA), com 14 m de comprimento, 0,10 mm d.i. e 0,8 μm de espessura do filme sob as seguintes condições de operação: FID em 230 °C, temperatura da coluna em 160 °C, velocidade linear do H_2 em 50 cm s^{-1} e volume de injeção de 1 μL , em modo *split* na razão de 1:500. Os demais parâmetros do FID foram N_2 , como “gás de *makeup*” (utilizado para conduzir os analitos pelo detector a fim de diminuir o alargamento da banda), em fluxo de 30 mL min^{-1} ; H_2 em 40 mL min^{-1} e ar sintético em 400 mL min^{-1} .

3.2.2. Sistema de Eletroforese Capilar

Os experimentos foram conduzidos pelo sistema de CE 7100 (HP3d CE, Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia, EUA), disponível na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), equipado com detector por arranjo de diodos (DAD, *Diode Array Detector*), com detecção indireta por UV em 224 nm, temperatura controlada no interior do cartucho em 25°C, aquisição e tratamento de dados em *software* (HP ChemStation, rev A.06.01). As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (12,0 mbar por 4 s) e o sistema eletroforético foi operado sob polaridade normal e tensão elétrica constante de +19 kV. Para todos os experimentos foi utilizado o capilar de sílica fundida com revestimento externo de flúor-polímero (TSH) (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA), com 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo), 75 μm diâmetro interno (d.i.) e 375 μm de diâmetro externo (d.e.).

Antes do uso, os capilares novos foram condicionados através de *flush* com NaOH 1,0 mol L⁻¹ (40 min), água purificada por osmose reversa (20 min) e solução do eletrólito (20 min). Entre as corridas, houve a limpeza do capilar com NaOH 1,0 mol L⁻¹ (3 min), água purificada por osmose reversa (3 min) e solução de eletrólito (3 min). Este condicionamento mostrou-se satisfatório para repetibilidade dos tempos de análise e resolução dos picos.

3.3. AMOSTRAS

3.3.1. Sínteses de biodiesel

3.3.1.1. Catálise Básica

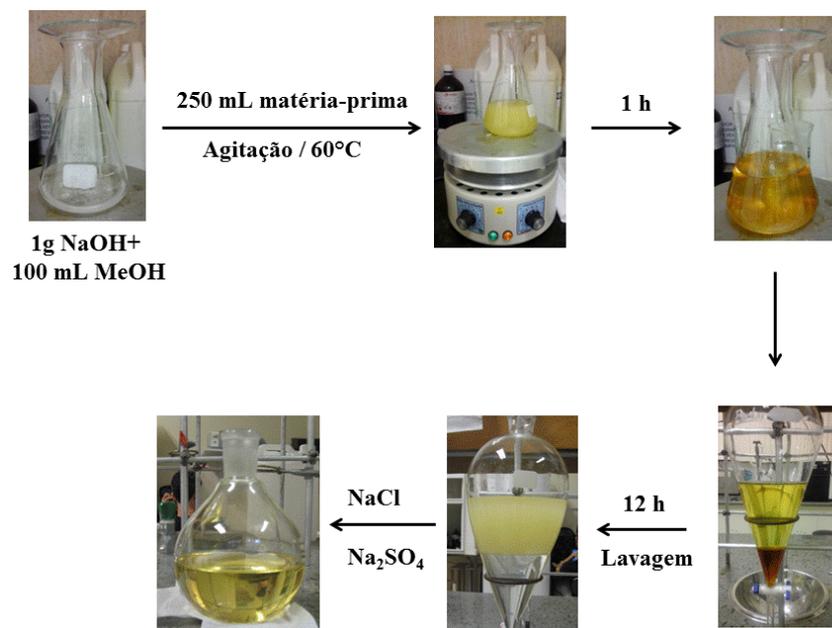
Cada matéria-prima foi submetida ao processo de transesterificação alcalina. Uma solução com 1 g de NaOH e 100 mL de MeOH foi aquecida em, aproximadamente, 60 °C e, em seguida, adicionou-se 250 mL de matéria prima. Após a mistura, a reação foi conduzida na temperatura citada anteriormente ($\approx 60^{\circ}\text{C}$) e sob agitação em recipiente fechado com vidro de relógio, para evitar a evaporação de MeOH, durante o período de uma hora (Ferrari et al., 2005; Dib, 2010).

Enquanto a matéria-prima era adicionada, observou-se a mudança da coloração, de amarelo transparente para amarelo opaco e então, para amarelo em um tom mais escuro e translúcido. Esta observação também foi realizada por Dib (2010), indicando que os triglicerídeos se converteram em ésteres metílicos (Dib, 2010).

A amostra transesterificada foi transferida para um funil de separação para decantação, por 12 horas. Após este período, foram observadas duas fases: biodiesel (fase superior) e glicerol (fase inferior). Depois de separados, foram adicionados 250 mL de água, purificada por osmose reversa, ao biodiesel por três vezes ou até que o produto mantivesse seu pH próximo a 7,0. Após esta etapa, foram adicionados 250 mL de solução saturada de NaCl, para que houvesse a desestabilização de emulsões presentes; e os traços de umidade foram eliminados através da adição de sulfato de sódio anidro.

A Figura 9 mostra o processo de obtenção do biodiesel, por reação de transesterificação com catalisador básico.

Figura 9 - Obtenção de biodiesel, através de reação de transesterificação, com catalisador básico.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Os rendimentos foram calculados a partir da comparação do volume inicial da matéria-prima com o volume final do biodiesel. Por exemplo, o biodiesel provindo de soja, apresentou um volume final, aproximado de 225 mL, apresentando, portanto, o rendimento de 90%. A amostra provinda de óleo de fritura apresentou o menor rendimento de 75%, já para as demais, o rendimento foi de, aproximadamente, 90%. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e ao abrigo de luz.

3.3.1.2. Catálise Ácida

Para a síntese de biodiesel, por catálise ácida, 100 mL de óleo de soja foram adicionados, juntamente com 2,4 mL de HCl (teor de 37%) e 100 mL de MeOH em um recipiente fechado e levado ao aquecimento (≈ 60 °C) sob agitação.

A reação também foi acompanhada pela mudança de coloração que foi observada depois de, aproximadamente, 5 horas. No processo de separação, porém, foi possível observar, além da coloração mais escura do biodiesel (Figura 10), a parte

inferior (glicerol) apresentou-se, aparentemente, com menor viscosidade e com muitas gotículas que, provavelmente, seriam de matéria-prima não-transesterificada.

Figura 10 - Separação de biodiesel obtido por catálise ácida.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Na tentativa do processo de lavagem do biodiesel, com água, houve a formação de emulsão estável, diminuindo o rendimento do produto final, para, aproximadamente, 60%. Este fato deve-se, provavelmente, da presença de água no catalisador utilizado, favorecendo o processo de hidrólise, prejudicando o rendimento da reação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DETERMINAÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS, POR *FAST GC* - FID

4.1.1. Preparo das amostras

O preparo de amostra para a determinação de ésteres metílicos em biodiesel, por GC-FID, consistiu na diluição da amostra em hexano (1% v/v) em um microtubo para centrífuga de 1,5 mL, que foi levado ao vortex por 2 min. E então, a amostra foi injetada no equipamento de GC (Figura 11).



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Para análises de ésteres metílicos, em amostras de biodiesel, por GC, foi proposto o método de *Fast GC* - *FID*, com coluna de fase estacionária de líquido iônico de alta polaridade. Esta técnica apresenta como atrativo, o curto tempo de análise, além do uso da coluna de líquido iônico que proporciona melhor separação, sem o uso de técnicas multidimensionais.

O método foi baseado no trabalho de Ragonese et al, que propôs a separação de ésteres metílicos em amostras de B20, aplicando temperatura programada, de 50–270 °C a 70 °C min⁻¹ (Ragonese et al., 2009).

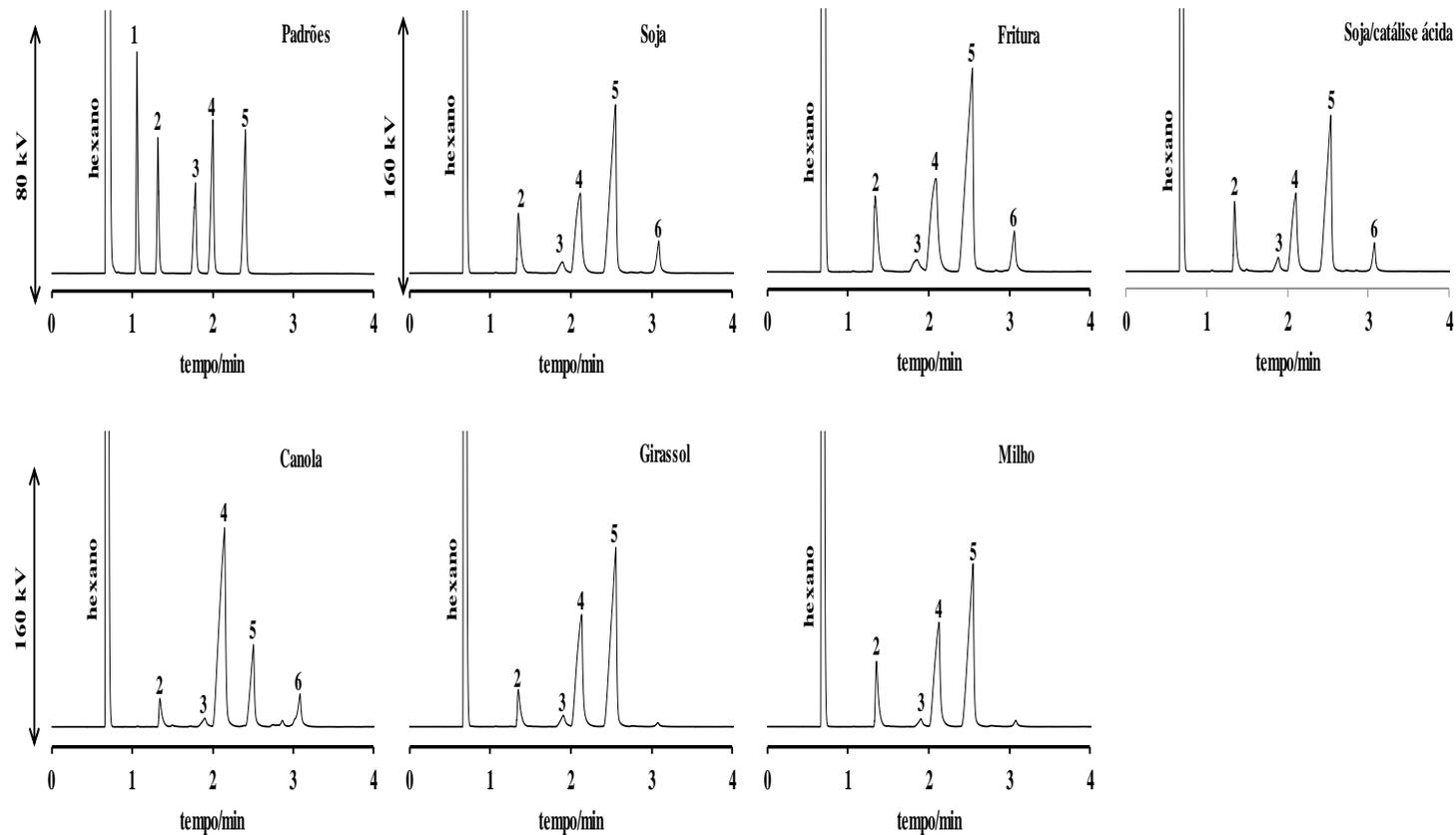
No presente trabalho, a programação de temperatura não foi necessário, já que amostra analisada não apresentava hidrocarbonetos, que poderiam influenciar na análise.

Levando em conta que MMe está presente em menos de 0,5% m/m em matérias-primas (Brasil, 1999) de biodiesel e que não foi detectado nas amostras (Figura 12), este foi utilizado como PI, na concentração fixa de 2,0 g L⁻¹. Assim, a determinação de ésteres em biodiesel foi realizada conforme a Equação 8.

$$[I] = \frac{[PI]A_I}{A_{PI}} \quad (8)$$

Onde [I] é a concentração do analito, [PI] é a concentração do PI, fixa em 2,0 g L⁻¹, A_I é a área do analito e A_{PI}, a área do PI.

Figura 12 - Cromatogramas de mistura de padrões e amostras de biodiesel obtidas através da reação de transesterificação de diferentes óleos vegetais, com catalisador básico e de óleo de soja, com catalisador ácido. Condições operacionais: FID em 230 °C, temperatura da coluna em 160 °C, velocidade linear do H₂ em 50 cm s⁻¹, injeção em modo *split* na razão de 1:500, coluna capilar SLB-IL 111 com 14 m de comprimento, 0,10 mm d.i. e 0,8 µm de espessura do filme. Picos: 1- MMe; 2- PMe; 3- EMe; 4- OMe; 5- LMe; 6- LnMe



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Assim, com as concentrações de cada analito (Tabela 1) e suas porcentagens em massa nas amostras (Figura 13), foi possível verificar se as reações de transesterificação foram bem sucedidas ou não, comparando com as concentrações médias de AG encontrados nas matérias-primas.

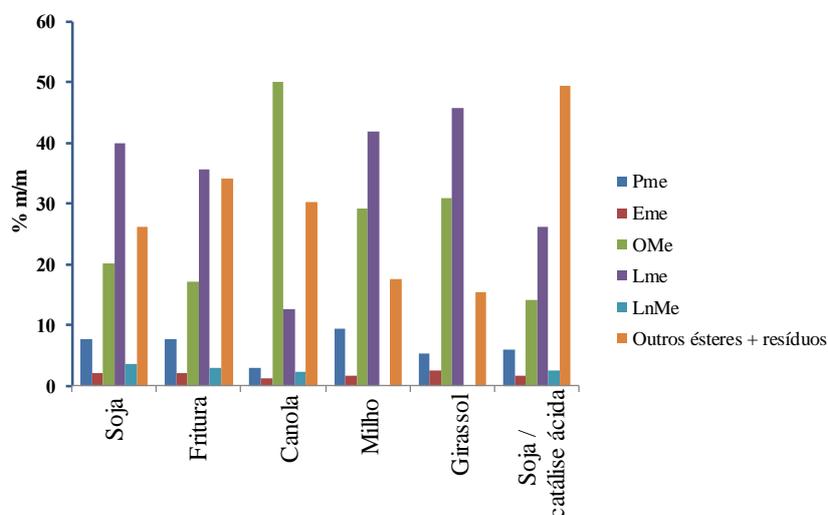
Tabela 1 - Concentrações de ésteres metílicos nas amostras de biodiesel.

Biodiesel	Concentrações nas amostras/g L ⁻¹				
	[PMe]	[EMe]	[OMe]	[LMe]	[LnMe]
Soja	72,93 ± 2,13	19,80 ± 0,09	188,32 ± 2,54	374,11 ± 6,12	34,40 ± 1,24
Fritura	67,18 ± 0,16	18,71 ± 0,20	148,54 ± 0,25	309,11 ± 13,32	26,17 ± 0,07
Canola	25,44 ± 0,51	11,15 ± 0,33	416,36 ± 7,30	105,04 ± 0,79	20,06 ± 1,01
Milho	82,74 ± 1,25	14,73 ± 1,30	253,66 ± 2,40	364,60 ± 0,46	Nd
Girassol	43,15 ± 0,07	20,22 ± 0,08	250,59 ± 5,35	370,88 ± 4,15	Nd
Soja/catálise ácida	47,12 ± 0,66	13,47 ± 0,51	113,53 ± 1,83	209,08 ± 5,15	20,26 ± 0,61

nd: não detectado

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Figura 13 - Porcentagens de ésteres metílicos em amostras de biodiesel e a soma das porcentagens de outros ésteres (não detectados) e resíduos (mono, di-glicerídeos, glicerol, catalisador e água).



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Em amostras obtidas por catálise básica, as concentrações de ésteres foram dentro do esperado, exceto para a de óleo utilizado em processos de frituras, que apesar de apresentar concentrações de ésteres consideráveis, apresentou uma porcentagem grande de material não transesterificado e/ou resíduos. Para a amostra obtida por catálise ácida, não foram observados bons rendimento e concentrações, indicando que as condições para a reação ainda precisam ser otimizadas.

4.2. DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM BIODIESEL, POR CZE - UV

4.2.1. Preparo das amostras

A princípio, o preparo de amostra de biodiesel baseou-se no trabalho de mestrado (Sato et al., 2014), onde foi otimizado um método, por CZE - UV, para determinação de acidez livre em diferentes tipos de óleo vegetal. Esse preparo consistia na extração etanólica, a 60°C, de 0,5 – 1,5 g de óleo, em um balão volumétrico de 5,00 mL, com adição de C13:0, como padrão interno (PI) e agitação em vortex, em 3200 rpm (49 rcf), por 2 minutos (Sato et al., 2014). No entanto, o preparo de amostra de biodiesel baseado no trabalho supracitado, não alcançou resultados satisfatórios, uma vez que a amostra apresentou solubilidade tanto em EtOH quanto em MeOH, inviabilizando o processo de extração líquido-líquido.

Uma vez que o procedimento para a determinação de acidez livre em diferentes tipos de óleo vegetal não apresentou resultado satisfatório para a amostra de biodiesel, novas abordagens de estratégias foram consideradas. Neste sentido, após criteriosos testes de solubilidade em diferentes solventes, o MeOH foi selecionado como solvente de solubilização. Uma vez que durante os testes de solubilidade foi constatado que a agitação da mistura biodiesel com metanol através do uso de vortex apresentava influência positiva para a solubilidade da mistura, o tempo de agitação por vortex passou a ser uma variável a ser investigada. Logo, no intuito de investigar a etapa de preparo de amostra um planejamento fatorial do tipo 3^2 , de três níveis (-1, 0, 1) e dois fatores ou variáveis (massa de amostra e tempo de agitação em vortex), com triplicata no ponto central (Tabela 2), foi proposto. Para cada ensaio experimental do planejamento fatorial 3^2 , as amostras foram pesadas em balão volumétrico de 1,00 mL, sendo adicionado a quantidade correspondente a concentração final de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de

PI e o volume do balão volumétrico foi completado com MeOH. Os demais parâmetros experimentais como composição do eletrólito, dimensões do capilar, voltagem, comprimento de onda, tempo de injeção e temperatura do cartucho foram mantidos constantes.

Tabela 2 – Planejamento fatorial 3^2 para preparo de amostra nas análises em CZE - UV.

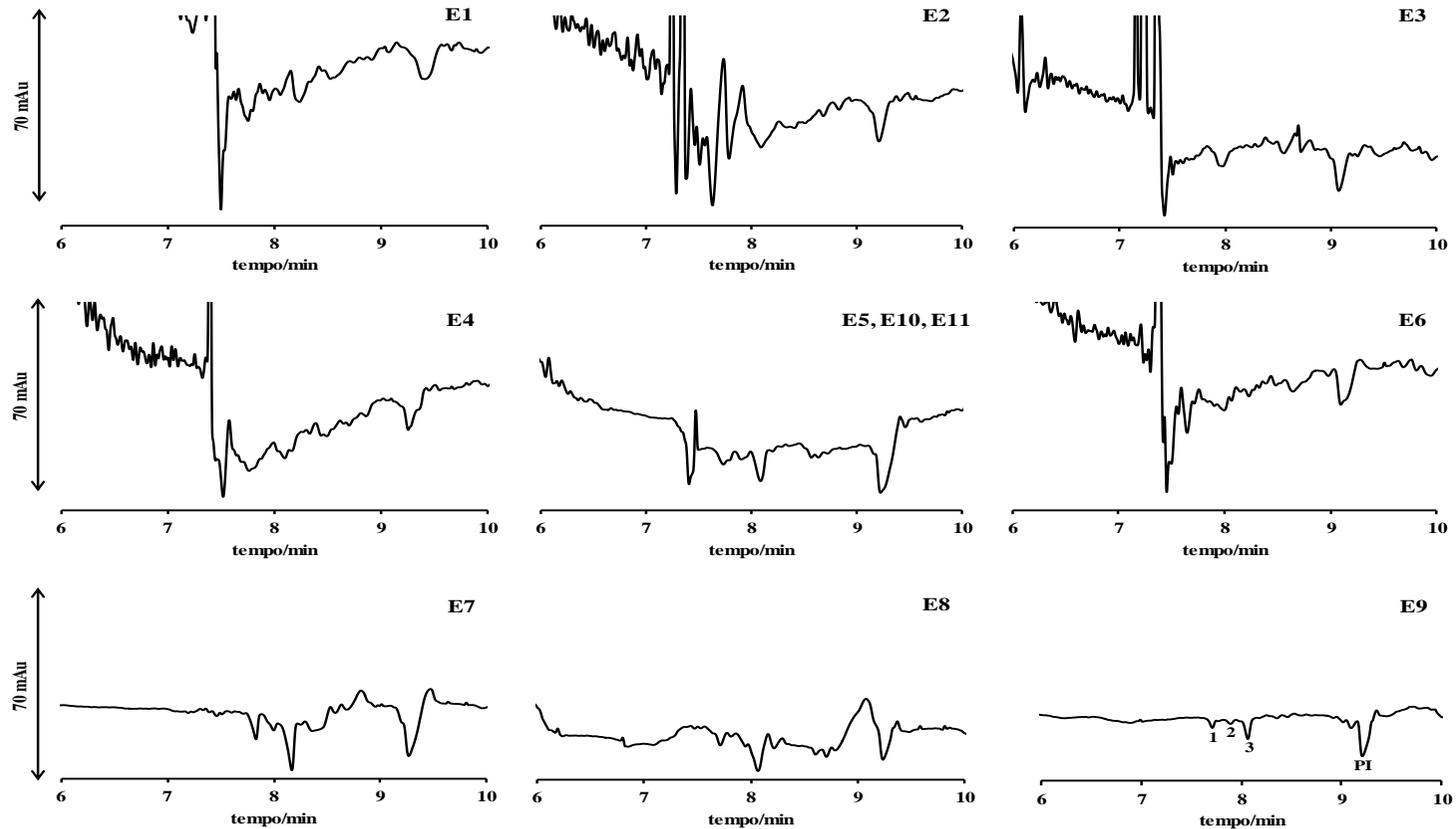
Experimento	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11
Massa/g	-1	-1	-1	0	0	0	+1	+1	+1	0	0
Tempo de agitação/min	-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1	0	0

Massa/g: (-1): 0,5; (0): 0,6; (+1): 0,7. Tempo de agitação/min: (-1): 3; (0): 5; (+1): 7

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Para a escolha do melhor experimento, as amostras foram analisadas por CZE, utilizando o método já otimizado para análises de AG, por detecção indireta. O eletrólito consistiu em $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tampão fosfato ($\text{pH} \approx 7,2$), $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij[®] L23, $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS, 2,1 % de octanol e 45 % de ACN (Barra et al., 2012; Sato et al., 2014). A resposta avaliada no conjunto de experimentos realizados teve como peso a avaliação visual nos eletroferogramas apresentados na Figura 14, levando-se em consideração como critério a qualidade do sinal dos picos, a qualidade de separação e a estabilidade de linha base.

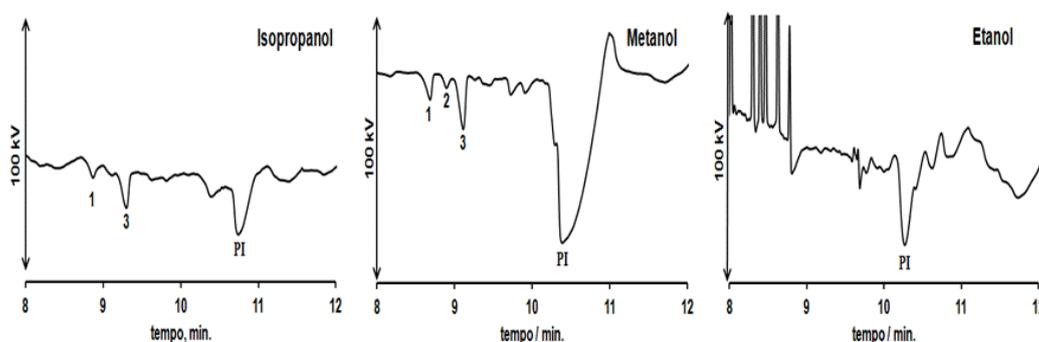
Figura 14 - Eletroferogramas dos experimentos referentes ao planejamento fatorial 3^2 , com amostras diluídas em MeOH. Solução de eletrólito: $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tampão fosfato, $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij[®] L23, $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS, 2,1% de octanol e 45% de ACN. **Condições operacionais:** injeção de 12,0 mbar por 4 s; tensão de + 19 kV; 25°C ; capilar tipo TSH, de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm de comprimento efetivo, 75 μm d.i. e 375 μm d.e. **Picos:** (1) C18:1, (2) C16:0, (3) C18:2, (PI) C13:0.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Com exceção da amostra de biodiesel sintetizado via catálise ácida, o preparo escolhido foi o correspondente ao Experimento E9 (0,7 g de biodiesel e 7 min de agitação por vortex), que apresentou melhor resultado, tendo como referência os critérios de escolha anteriormente relacionados. A partir dos resultados obtidos do planejamento fatorial 3^2 , ainda foram realizados testes de diluição comparativos do MeOH frente a outros solventes, a saber em EtOH e IsOH, afim de atestar se o MeOH de fato se consagraria como o solvente de melhor opção para a etapa de diluição da amostra. Através dos eletroferogramas apresentados na Figura 15, verifica-se que a amostra diluída com MeOH apresentou, de fato, melhor separação e estabilidade na linha base.

Figura 15 - Eletroferogramas com diferentes solventes em análises de acidez livre em biodiesel. Eletrólito: 15 mmol L^{-1} de solução tampão $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH $\sim 7,2$), $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS, $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij 35®, 45 % v/v de ACN e 2.1 % de octanol. Picos: (1) C18:1 ; (2) C16:0; (3) C18:2; (PI) C13:0.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

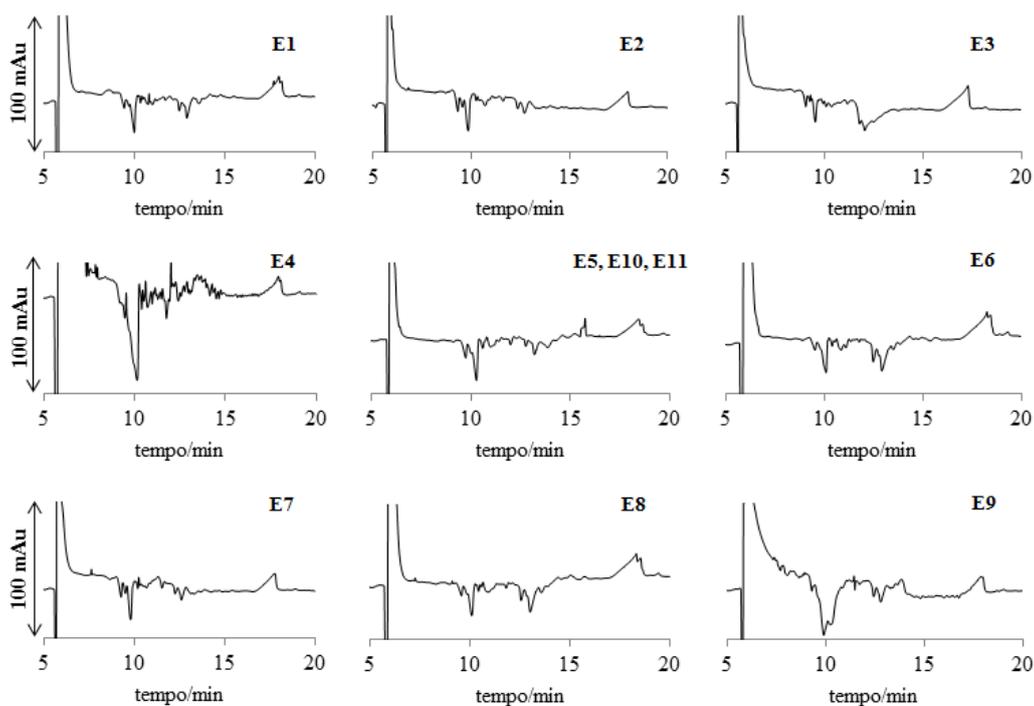
Este fato pode ser atribuído, provavelmente, à menor viscosidade do MeOH (0,55 cP), em relação aos demais álcoois testados (1,11 e 2,05 cP, para EtOH e IsOH, respectivamente), pois, quando utiliza-se o modo de injeção hidrodinâmica, que consiste na aplicação de diferença de pressão entre as duas extremidades do capilar, quanto menor a viscosidade da amostra, maior o volume injetado e, conseqüentemente, maior a quantidade de analito (Baker, 1995; Xu, 1996). A quantidade de amostra injetada pode ser determinada pela equação de Poiseuille (Equação 9).

$$V_c = \frac{\Delta P \pi (d.i.)^4 t}{128 \eta L} \quad (9)$$

4.2.2. Preparo da amostra de biodiesel sintetizado via catálise ácida

Para as análises de biodiesel obtido via catálise ácida, não foram obtidas separações com boas resoluções entre os analitos, com nenhum dos experimentos indicados da Tabela 2 (Figura 16).

Figura 16 - Eletroferogramas dos experimentos referentes ao planejamento fatorial 3^2 , da amostra de biodiesel produzido por catálise ácida. Solução de eletrólito: $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tampão fosfato, $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij[®] L23, $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS, 2,1 % de octanol e 45 % de ACN. **Condições operacionais:** injeção de 12,0 mbar por 4 s; tensão de + 19 kV; 25°C; capilar tipo TSH, de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm de comprimento efetivo, 75 μm d.i. e 375 μm d.e.

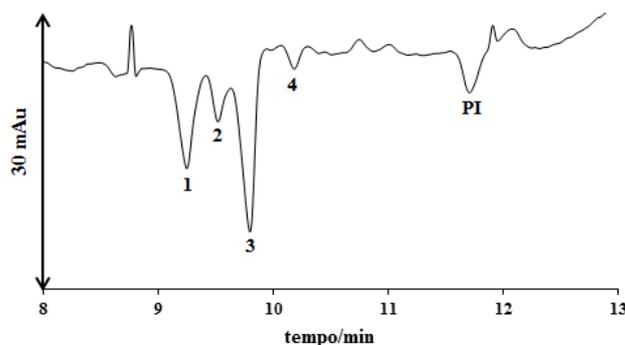


Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Uma alternativa para o preparo da amostra, a fim de obter uma melhor separação, foi a utilização do processo de extração lipídica adaptado do trabalho publicado por Folch e colaboradores (Folch et al., 1957). Foi pesado 0,70 g da amostra em um tubo, adicionou-se 1,4 mL de MeOH, 0,70 mL de clorofórmio e o tubo foi levado ao agitador vortex, por 2 minutos. Adicionou-se mais 0,70 mL de clorofórmio e agitou-se por 30 segundos em vortex. A seguir, foi adicionado mais 0,70 mL de água purificada e agitou-se por mais 30 segundos. Após o descarte da fase superior (aquosa), adicionou-se Na_2SO_4 anidro e a solução foi filtrada para um balão de fundo chato. O tubo e o papel de filtro utilizados foram lavados com clorofórmio. O balão de fundo chato foi levado ao rotaevaporador a 60 °C por, aproximadamente, 15 minutos, até a verificação na diminuição do volume (evaporação do clorofórmio).

O extrato lipídico foi transferido, com auxílio de MeOH, para um balão volumétrico de 5,00 mL e o volume completado com MeOH. Esta diluição foi realizada a fim de que houvesse volume suficiente para o preenchimento dos *vials* para injeção no equipamento de CE. Um eletroferograma referente a esse processo é mostrado na Figura 17.

Figura 17 - Eletroferograma para determinação de AGL em biodiesel obtido por catálise ácida. Solução de eletrólito: 15,0 mmol L⁻¹ tampão fosfato, 8,3 mmol L⁻¹ de Brij[®] L23, 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS, 2,1 % de octanol e 45 % de ACN. **Condições operacionais:** injeção de 12,0 mbar por 4 s; tensão de + 19 kV; 25 °C; capilar tipo TSH, de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm de comprimento efetivo, 75 µm d.i. e 375 µm d.e. **Picos:** (1) C18:1, (2) C16:0, (3) C18:2, (4) C18:3, (PI) C13:0.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Através da Figura 17, foi possível observar uma melhor separação dos analitos. No entanto, este resultado poderia ser consequência de uma maior diluição da amostra e não do processo de extração. Assim, para uma melhor investigação, foi proposto um novo planejamento fatorial³², mantendo os mesmos tempos de agitação do planejamento anterior, porém, com massas de amostra menores (Tabela 3).

Tabela 3 – Planejamento fatorial 3² para preparo de amostra de biodiesel obtida via catálise ácida.

Experimento	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22
Massa/g	-1	-1	-1	0	0	0	+1	+1	+1	0	0
Tempo de agitação/min	-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1	0	0

Massa/g: (-1): 0,1; (0): 0,3; (+1): 0,5. Tempo de agitação/min: (-1): 3; (0): 5; (+1): 7

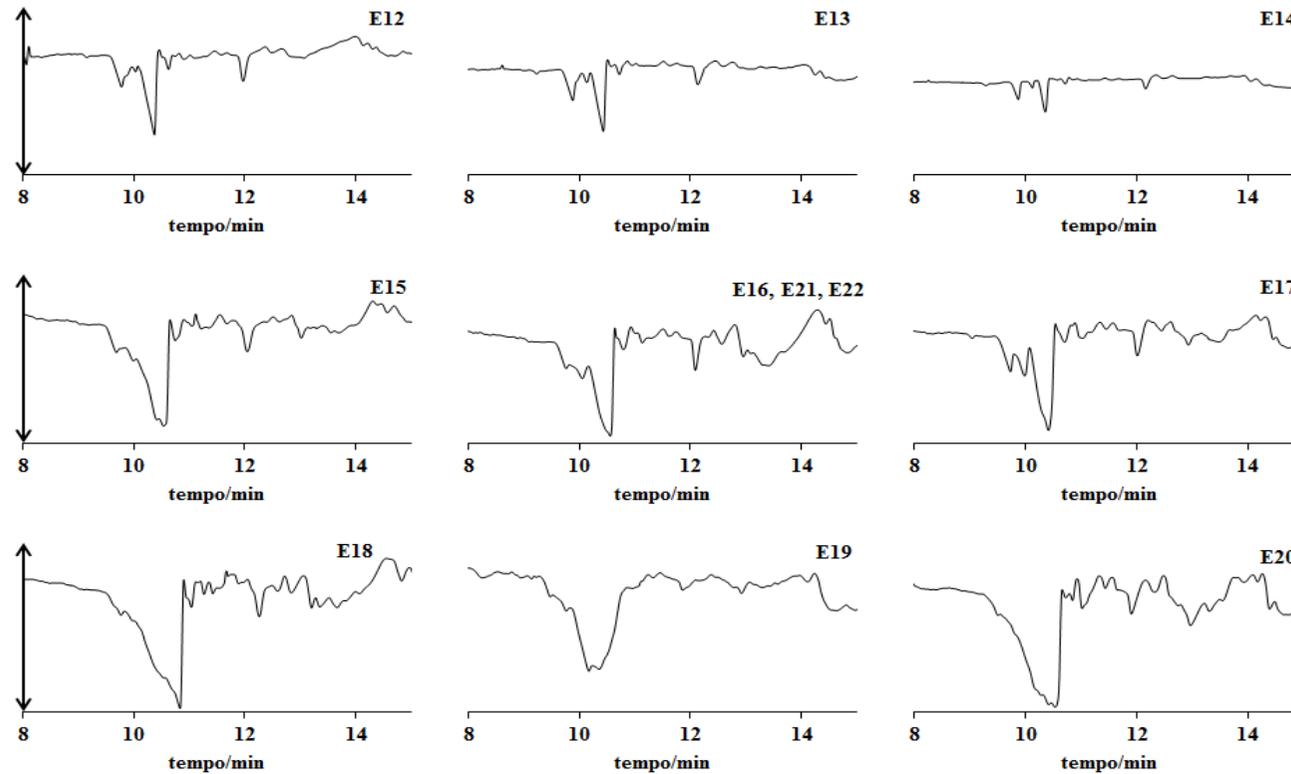
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Deste modo, o preparo destas amostras consistiu da mesma forma citada anteriormente: pesou-se as respectivas massas indicadas na Tabela 3, em um balão volumétrico de 1 mL, adicionou-se PI, para sua concentração final de 0,5 mmol L⁻¹, e completou-se o volume com MeOH.

Os experimentos foram avaliados através de seus eletroferogramas correspondentes (Figura 18), onde foi possível observar que a melhor resolução foi obtida com o experimento E14 (0,10 g e 7 minutos de agitação).

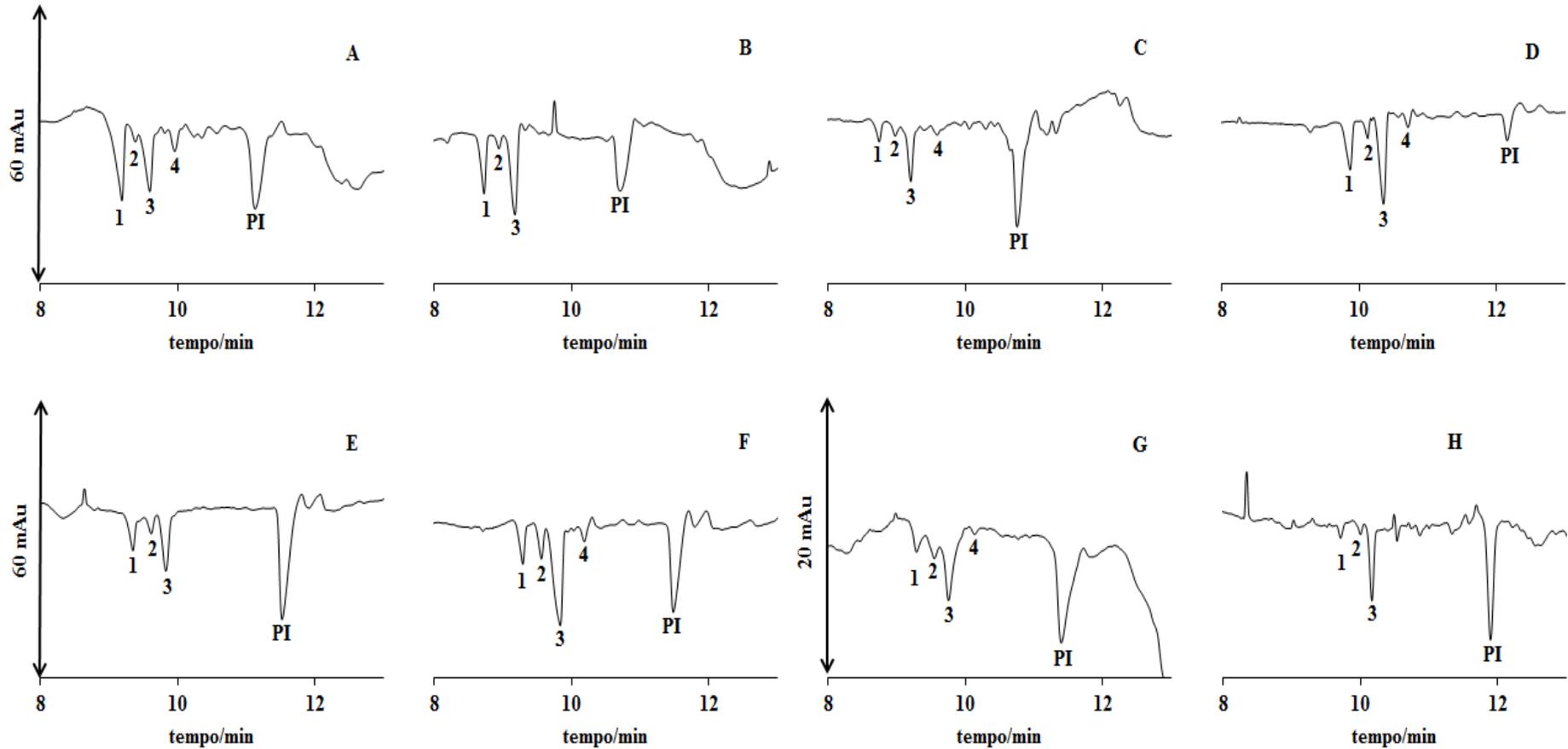
Assim, finalmente, os parâmetros definidos para o preparo das amostras de biodiesel obtidas por catálise básica foram de 0,70 g de amostra e 7 minutos de agitação, enquanto que para a amostra obtida por catálise ácida consistiu em 0,70 g de biodiesel e agitação por 7 minutos. Seus respectivos eletroferogramas estão demonstrados na Figura 19.

Figura 18 - Eletroferogramas para determinação de AGL em biodiesel obtido via catálise ácida, de acordo com o Planejamento fatorial 3^2 da Tabela 3. Solução de eletrólito: $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tampão fosfato, $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij[®] L23, $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS, 2,1 % de octanol e 45 % de ACN. **Condições operacionais:** injeção de 12,0 mbar por 4 s; tensão de + 19 kV; 25 °C; capilar tipo TSH, de 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm de comprimento efetivo, 75 μm d.i. e 375 μm d.e.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Figura 19 – Eletroferogramas para os preparos de amostras de otimizados. A - biodiesel de canola; B - biodiesel de girassol; C - biodiesel de óleo de fritura, D - biodiesel obtido via catálise ácida, E - biodiesel de soja - SC, F - biodiesel de soja - GO, G - biodiesel de soja - SP, H – biodiesel industrial. **Picos:** (1) C18:1, (2) C16:0, (3) C18:2, (4) C18:3, (PI) C13:0.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

4.3. QUANTIFICAÇÃO

4.3.1. Curva Analítica

Para a determinação da acidez livre nas amostras, foram construídas as curvas analíticas, por padronização interna, dos analitos, empregando a razão concentração do analito pela concentração do PI ($[AGL]/[PI]$) no eixo da abscissa e a razão das áreas de AGL pela do PI, no eixo da ordenada.

Foram utilizadas soluções padrões de C16:0, C18:1, C18:2 e C18:3, nas concentrações de 0,2; 0,6, 1,0; 1,4; 1,8 e 2,2 mmol L⁻¹. Os modelos, ajustados através da regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários, foram executados em triplicatas autênticas para cada nível experimental. e sua avaliação pode incluir a remoção de alguns pontos, se necessário, para a previsão correta do modelo. A homocedasticidade das observações foi verificada por teste de Levene, que é utilizado quando tem-se diferentes números de replicatas em um mesmo nível. Os valores utilizados para obtenção dos modelos de regressão encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores utilizados para os modelos de regressão.

AGL	[AGL]/[PI]	Replicata 1*	Replicata 2*	Replicata 3*
C16:0	0,4	0,19	0,18	—
	1,2	0,79	0,75	—
	2,0	1,19	1,24	1,26
	2,8	1,82	1,70	—
	3,6	2,05	2,08	2,17
C18:1	0,4	0,13	0,13	0,15
	1,2	0,43	0,47	0,45
	2,0	0,82	0,78	0,85
	2,8	1,56	1,12	1,32
	3,6	1,95	1,90	—
	4,4	2,51	2,47	—
C18:2	0,4	0,17	0,19	0,18
	1,2	0,54	0,55	0,58
	2,0	0,93	0,92	1,04
	2,8	1,69	1,49	—
	3,6	2,50	2,49	—
	4,4	2,51	2,49	—
	5,2	2,89	3,11	3,09
C18:3	1,2	0,35	0,29	—
	2,0	0,45	0,48	0,51
	2,8	0,70	0,89	—
	3,6	1,02	1,17	1,18
	5,2	1,69	1,68	—

*Razão entre as áreas do analito e PI.

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Para verificar a falta de ajuste do modelo, ou seja, a linearidade das curvas analíticas ajustadas para cada analito, foi aplicado o teste de hipótese a priori, que consiste na comparação do desvio padrão dos resíduos ($s_{y,x}$), com o desvio padrão dos valores de y (s_y), em relação a suas médias (Equação 10).

$$F_{\text{calc}} = \frac{s_{\bar{y},x}^2}{s_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p-2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m-p)} \quad (10)$$

Onde m_i é o número de medidas, p é o número de pontos da curva analítica do modelo e m é o produto entre m_i e p (Danzer e Currie, 1998). Na verificação da falta de ajuste, se o valor de F_{calc} for menor ou igual ao $F_{\alpha; v_1 = p-2; v_2 = m-p}$ (F_{tab}) a curva é considerada linear, o que significa que seu coeficiente angular poderá ser utilizado como fator de resposta (Fr) para quantificação dos analitos de interesse.

Os coeficientes de regressão e os testes de falta de ajuste estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros de regressão obtidos.

AGL	C. angular	C. linear	R ²	F _{calc}	F _{tab}
C16:0	0,594	0,019	0,995	3,89	4,35 ^a
C18:1	0,601	-0,242	0,970	1,38	3,36 ^b
C18:2	0,613	-0,137	0,994	1,84	3,11 ^c
C18:3	0,357	-0,178	0,988	1,16	4,35 ^a

^aF_{tab}(v₁=3; v₂=7); ^bF_{tab}(v₁=4; v₂=11); ^cF_{tab}(v₁=5; v₂=12)

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Uma vez que os modelos de regressão foram considerados satisfatórios, seus respectivos coeficientes angulares puderam ser utilizados, para quantificação, como fator de resposta (Fr), da Equação 11, desde que a concentração do padrão interno seja mantida fixa em 0,5 mmol L⁻¹ na amostra, conforme o experimento preliminar realizado com os padrões.

$$\frac{A_{AGL}}{[AGL]} = F_r \frac{A_{PI}}{[PI]} \quad (11)$$

Onde A_{AGL} é a área de cada AGL, A_{PI} é a área do PI, $[AGL]$ é a concentração, em mmol L^{-1} , para cada AGL e $[PI]$ é a concentração do PI, fixa em $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.3.2. Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LOD, *Limit Of Detection*) representa menor concentração que a substância de interesse pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (Ribani et al., 2004; Harris, 2005; Skoog, Douglas A. et al., 2009), enquanto que o limite de quantificação (LOQ, *Limit Of Quantification*) representa a menor concentração em que o analito de interesse pode ser medido. Esses limites podem ser determinados por três métodos diferentes: *i*) visual (determinado pela análise de amostras em concentrações conhecidas dos analitos); *ii*) sinal-ruído (aplicado somente para procedimentos analíticos que apresentam ruído na linha base); *iii*) baseado em desvio padrão da resposta e coeficiente angular da curva analítica (Ribani et al., 2004; Guideline, 2005).

No presente trabalho, LOD e LOQ foram determinados a partir da relação sinal-ruído (Equações 12 e 13, respectivamente).

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_{\text{ruído}} \times C_{\text{analito}}}{H_{\text{máxima}} - H_{\text{mínima}}} \quad (12)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_{\text{ruído}} \times C_{\text{analito}}}{H_{\text{máxima}} - H_{\text{mínima}}} \quad (13)$$

Onde $S_{\text{ruído}}$ é o desvio padrão do ruído, C_{analito} é a concentração do analito, $H_{\text{máxima}}$ é a altura máxima do pico e $H_{\text{mínima}}$ é a altura mínima do pico.

Assim, os LODs (mmol L^{-1}) foram 0,014 para C16:0, 0,061 para C18:1, 0,044 para C18:2 e 0,055 para C18:3. Os LOQs (mmol L^{-1}) foram 0,047; 0,203; 0,148 e 1,182 para C16:0, C18:1, C18:2 e C18:3, respectivamente.

4.3.3. Determinação da acidez

A determinação da acidez nas amostras de biodiesel, por CZE, pode ser dada em % acidez , expressa em C18:1, já que este é um parâmetro para acidez em óleos e gorduras e é muito utilizado para conversão de mg KOH/g de amostra (Lutz, 1977).

Assim, a partir do rearranjo da Equação 11, é possível determinar a % acidez (Equação 14), porém, em CE, leva-se em conta a soma dos AGL presentes na amostra e não apenas a concentração de C18:1, para uma melhor exatidão (Balesteros et al., 2007; Sato et al., 2014).

$$\%_{\text{acidez}} = \frac{MM_{\text{C18:1}}[\text{PI}]V \sum A_{xi}}{F_r A_{\text{PI}m}} 100 \quad (14)$$

Onde $MM_{\text{C18:1}}$ é a massa molecular de C18:1 ($282,5 \text{ g mol}^{-1}$), [PI] é a concentração do PI, fixa em $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, V é o volume em litros, Fr é o fator de resposta de C18:1, A_{PI} é a área de PI na amostra e A_{xi} é a área de cada AGL na amostra, obtida através das integrações de cada pico correspondente no eletroferograma.

Os teores de acidez foram determinados através de duplicatas autênticas e estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Teores de acidez em amostras de biodiesel, por CE.

Amostra de biodiesel	Acidez/%, expressa em C18:1
Canola	0,048 ± 0,006
Girassol	0,0453 ± 0,0002
Fritura	0,028 ± 0,001
Catálise ácida	0,92 ± 0,02
Soja-SC	0,044 ± 0,002
Soja-GO	0,0528 ± 0,0004
Soja-SP	0,018 ± 0,003
Industrial	0,036 ± 0,007

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

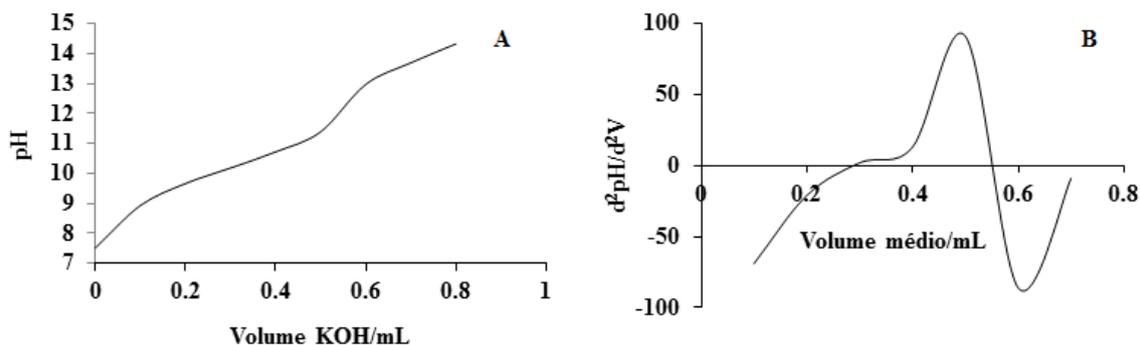
Através dos teores de acidez encontrados, observa-se que a amostra obtida via catálise ácida, apresentou grau de acidez muito maior que as demais amostras, o que pode ser justificado pela presença de água no catalisador utilizado, uma vez que este fato pode conduzir à hidrólise de ésteres, formando AGL.

4.3.4. Comparação entre titulação potenciométrica e CZE - UV

A fim de confrontar a confiabilidade do método utilizado por CZE - UV, foram determinados os teores de acidez das mesmas amostras de biodiesel, pelo método oficial, que consistiu na titulação potenciométrica das amostras diluídas em solução da mistura IsOH/tolueno (1:1 v/v) e utilizou-se a solução de KOH em IsOH, como titulante (ASTM, 2004b). As análises foram realizadas em duplicatas autênticas.

Para determinar o volume do ponto final da titulação, foi utilizada a segunda derivada da curva pH x volume de titulante (Figura 20 A). Assim, o volume foi determinado pelo ponto de interseção com o eixo do volume (Figura 20 B).

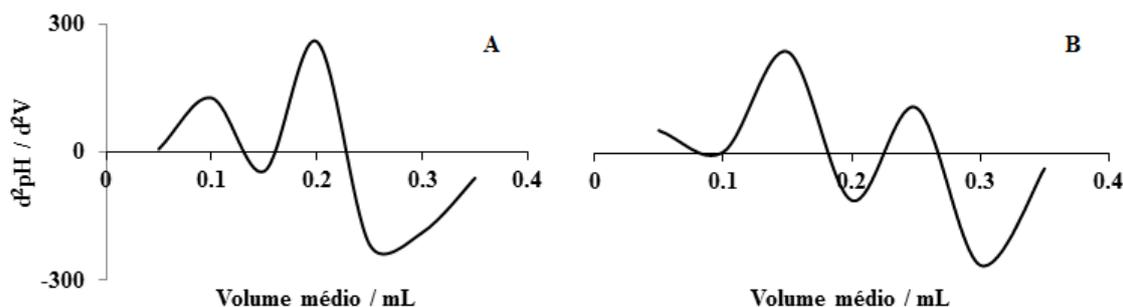
Figura 20 – Curvas referentes a titulação potenciométrica. A – pH x volume de titulante;
B – segunda derivada da curva A.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Algumas amostras, no entanto, como as de biodiesel obtido a partir de óleo de canola e o biodiesel industrial, não apresentaram curvas pH x volume de titulante bem definidas, gerando curvas de derivada segunda com dois pontos de inflexão cada uma (Figura 21). Assim, para estas amostras, também foram realizadas titulações colorimétricas, utilizando fenolftaleína como solução indicadora, a fim de confirmar o volume do ponto final.

Figura 21 – Curvas da derivada segunda de amostras de biodiesel, por titulação potenciométrica. A – canola. B – industrial.



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Com as definições dos pontos finais de cada amostra, pode-se determinar os teores de acidez, expressos em C18:1 (Tabela 7).

Tabela 7 - Teores de acidez em amostras de biodiesel, por titulação potenciométrica.

Amostra de biodiesel	Acidez/%, expressa em C18:1
Canola	0,04311 ± 0,00007
Girassol	0,0434 ± 0,0001
Fritura	0,030 ± 0,006
Catálise ácida	0,64 ± 0,04
Soja-SC	0,098 ± 0,007
Soja-GO	0,0902 ± 0,0002
Soja-SP	0,0347 ± 0,0004
Industrial	0,0424 ± 0,0008

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA.

Comparando os resultados obtidos por CZE - UV e por titulação potenciométrica, pelo teste de Wilcoxon pareado, não há diferenças significativas em um nível de 95% de confiança, pois seu p-valor foi de 0,401 (p-valor > 0,05). O teste de Wilcoxon pareado foi proposto pelo fato dos desvios das observações não apresentarem comportamento normal, ou seja, se tratar de uma distribuição não paramétrica. Os resultados estatísticos indicam que não há evidência, no intervalo de 95% de confiança, para não se utilizar o método por CZE-UV como alternativa para determinação de acidez em amostras de biodiesel. Apesar do método por CZE-UV ser mais dispendioso, devido ao elevado custo de aquisição do equipamento, em comparação com a titulação potenciométrica clássica, o primeiro apresenta algumas vantagens interessantes como menor consumo de solventes orgânicos, o que vai diretamente ao encontro dos preceitos positivos imanentes a “Química Verde”. Além disso, configura-se como um método de maior eficiência, pois apresenta maior grau de seletividade e especificidade, posto que a acidez é calculada, especificamente, a partir do somatório de cada ácido graxo livre separado e identificado. Por outro lado, a titulação potenciométrica, apesar de baixo custo para aquisição da infraestrutura, requer o uso de tolueno, o qual acarreta significativo grau de toxicidade à exposição do analista, para a solubilização da amostra. Além disso, a limpeza dos eletrodos é mediada pela utilização de EtOH ou acetona entre as análises. Além disso, quando se realiza titulação potenciométrica, o resultado poderá ser influenciado por resíduos de catalisador que, geralmente, são ácidos e bases fortes (Komers et al., 1997).

5. CONCLUSÕES

A determinação individual de ésteres é importante para a avaliação da qualidade de biodiesel, devido à tendência de oxidação e estudos de emissões, como material particulado, CO e óxidos de nitrogênio. Neste trabalho foi desenvolvido e otimizado método empregando *Fast GC-FID*, com uma coluna capilar com fase estacionária de líquido iônico, para análise de ésteres metílicos em um tempo de análise em torno de 3 minutos. Com isso, pode-se analisar um grande número de replicatas em um curto tempo, diminuindo os consumos de energia, volumes de gases e, conseqüentemente, o custo por amostra. E ainda, o uso de isoterma para temperatura do forno e o simples preparo de amostra, faz aumentar a frequência analítica e diminuir os consumos de solvente e amostra.

A determinação da acidez também é um parâmetro importante, pois se pode avaliar a degradação e qualidade das reações de transesterificação, através dos AGL presentes no produto. A proposta apresentada para análise de acidez por CZE-UV teve como ponto forte, a ser elucidado, a etapa de preparo de amostra. Dentro deste contexto, foi possível observar que, além da massa da amostra, o solvente e o tempo de agitação se desdobraram em fatores chaves para o sucesso da análise, tangenciando a etapa de preparo das amostras. Assim, o planejamento fatorial apresentou-se como uma ferramenta estatística imprescindível para a otimização dos parâmetros experimentais. O método otimizado, por CZE-UV, mostrou-se como uma técnica alternativa muito interessante, uma vez que foi possível a determinação dos AGL em amostras de biodiesel, tendo ainda como diferencial a detecção individual dos AGL saturados e insaturados, o que permite avaliar ou prever o grau de propensão à oxidação em função da presença dos AGL insaturados. Além disso, o método por CZE-UV é indiferente e insensível à influência de possíveis resíduos de ácidos e/ou bases fortes remanescentes do processo reacional empregado, ou seja, catálise ácida ou base, o que não se verifica com a titulação potenciométrica. Finalmente, o método desenvolvido por CZE-UV quando comparado ao método oficial por titulação potenciométrica não apresentou diferenças significativas no intervalo de 95% de confiança para as diferentes amostras de biodiesel analisadas.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, J. L.; ARMSTRONG, D. W. High-stability ionic liquids. A new class of stationary phases for gas chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 18, p. 4851-4858, 2003.

ARICETTI, J. A.; TUBINO, M. A green and simple visual method for the determination of the acid-number of biodiesel. **Fuel**, v. 95, p. 659-661, 2012.

ASTM. **Standard test method for acid and base number by color-indicator titration. D 974**. Estados Unidos: ASTM International. 04 2004a.

_____. **Standard test method for acid number for petroleum products by potentiometric titration. D 664**. Estados Unidos: ASTM International. D 664 2004b.

ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2070-2094, 2012.

AUGUSTO, F. **Cromatografia a Gás: Curso em Diapositivos**. Chemkeys - Liberdade para aprender. www.chemkeys.com.br: Creative Commons (BY-NC-SA) 2000.

BAIG, A.; PASZTI, M.; NG, F. T. T. A simple and green analytical method for acid number analysis of biodiesel and biodiesel blends based on potentiometric technique. **Fuel**, v. 104, p. 426-432, 2013.

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis (Techniques in Analytical Chemistry)**. 1. John Wiley & Sons Inc., 1995.

BALESTEROS, M. R. et al. Determination of olive oil acidity by CE. **Electrophoresis**, v. 28, n. 20, p. 3731-3736, 2007

BARRA, P. M. D. et al. A rapid method for monitoring total trans fatty acids (TTFA) during industrial manufacturing of Brazilian spreadable processed cheese by capillary zone electrophoresis. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 456-461, 2012.

BRASIL. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais**. Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999. SANITÁRIA, A.-A. N. D. V. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 13 de outubro de 1999.

_____. **Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005.** AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. E. B. Diário Oficial da União, de 14 de janeiro de 2005.

_____. **Resolução ANP nº 14.** AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. E. B. A. Diário Oficial da União, em 18 de maio de 2012.

_____. **Resolução ANP 45.** AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. E. B. Diário Oficial da União de 26 de agosto de 2014.

_____. **Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016.** AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. E. B. Diário Oficial da União de 24 de março de 2016.

_____. Percentual obrigatório de biodiesel passa para 10%. **Notícias**, <http://www.anp.gov.br/noticias/4333-percentual-obrigatorio-de-biodiesel-passa-para-10>, 2018. Acesso em: 17 de outubro de 2018.

BUCHBERGER, W.; WINNA, K. Determination of free fatty acids by capillary zone electrophoresis. **Microchimica Acta**, v. 122, n. 1, p. 45-52, 1996/

CASTRO, R. D. J. C. et al. A Rapid Method for Determination of the Main Conjugated Linoleic Acid Precursors (C18: 2 n-6 and C18: 3 n-3) in Forage by Capillary Zone Electrophoresis with Ultraviolet Detection Using Gas Chromatography with Flame Ionization Detection as a Comparative Method. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 6, p. 1591-1597, 2015.

CHAVANNE, C. G. **Procédé de transformation d'huiles végétales em vue de leur utilisation comme carburants.** Bélgica. BE422877 1937.

CHYLIŃSKA-PTAK, M.; LAU, S.; STOLYHWO, A. Separation of Fatty Acids, their Methyl Esters and Triacylglycerols by Non-Aqueous Electrochromatography and HPLC. **Chem. Anal. (Warsaw)**, v. 49, p. 13, 2004.

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, p. 993-1014, 1998.

DE PAULA, A. J. A. et al. Utilização de argilas para purificação de biodiesel. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 91-95, 2011.

DELMONTE, P. et al. Separation characteristics of fatty acid methyl esters using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 3, p. 10, 2011.

DIB, F. H. **Produção de biodiesel a partir de óleo residual reciclado e realização de testes comparativos com outros tipos de biodiesel e proporções de mistura em um moto-gerador.** Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. 2010

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. D. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja - Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 5, 2005.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

GUERRA, E. P.; FUCHS, W. Biocombustível renovável: uso de óleo vegetal em motores. **Revista Acadêmica : Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 1, p. 103-112, 2010.

GUIDELINE, I. H. T. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland, 2005. p.1-17.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa.** 6. 2005.

HARVEY, D. **Modern Analytical Chemistry.** 1. The McGraw-Hill Companies, 2000. 798.

KNOTHE, G.; KRAHL, J.; GERPEN, J. V. **The Biodiesel Handbook.** 2 nd. Academic Press and AOCS Press, 2010.

KNOTHE, G.; SHARP, C. A.; THOMAS W. RYAN, I. Exhaust emissions of biodiesel, petrodiesel, neat methyl esters and alkanes in a new technology engine. **Energy & Fuels**, v. 20, p. 403-409, 2006.

KOEL, M.; KALJURAND, M. Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 11, p. 1993-2002, 2006.

KOMERS, K.; SKOPAL, F.; STLOUKAL, R. Determination of the neutralization number for biodiesel fuel production. **Lipid/Fett**, v. 99, n. 2, p. 52-54, 1997.

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

LUTZ, I. D. A. **Normas Analíticas: Métodos Físicos e Químicos Para Análise de Alimentos:** IAL São Paulo 1977.

- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 15, 1999.
- MAHAJAN, S.; KONAR, S. K.; BOOCOOCK, D. G. B. Determining the acid number of biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 6, p. 567-570, 2006.
- MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Practical approaches to fast gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 153-180, 2003.
- MATISOVÁ, E.; DÖMÖTÖROVÁ, M. Fast gas chromatography and its use in trace analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 199-221, 2003.
- MCCORMICK, R. L. et al. Impact of biodiesel source material and chemical structure on emissions of criteria pollutants from a heavy-duty engine. **Environ. Sci. Technol.**, v. 35, p. 1742-1748, 2001.
- MONTEIRO, M. R. et al. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta**, v. 77, p. 13, 2008.
- OLIVEIRA, M. A. D. et al. 20 Years of Fatty Acid Analysis by Capillary Electrophoresis. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14094-14113, 2014.
- PORTELA, F. M. **Efeito da catálise ácida e alcalina na produção e propriedades físico-químicas do biodiesel metílico de pinhão-mansão**. 2011. 76 (Master). Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.
- PORTO, B. L. S.; DE SOUZA, M. V. N.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Analysis of omega 3 fatty acid in natural and enriched chicken eggs by capillary zone electrophoresis. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 541-541, 2011.
- RAGONESE, C. et al. Conventional and fast gas chromatography analysis of biodiesel blends using an ionic liquid stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 51, p. 8992-8997, 2009.
- REFAAT, A. A. Correlation between the chemical structure of biodiesel and its physical properties. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 6, n. 4, p. 677-694, 2009.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SATO, R. T. et al. Rapid Separation of Free Fatty Acids in Vegetable Oils by Capillary Zone Electrophoresis. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 3, p. 241-246, 2014.

SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; PASQUINI, C. **Princípios de Química Analítica**. 6^a. Porto Alegre: 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Química Analítica**. 6. Bookman, 2009.

TAVARES, M. F. M. Capillary electrophoresis: Basic concepts. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismo de separação por eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TUBINO, M.; ARICETTI, J. A. A green method for determination of acid number of biodiesel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1073-1081, 2011.

XU, Y. Tutorial: Capillary Electrophoresis. **The Chemical Educator**, v. 1, n. 2, p. 1-14, 1996.

XUE, J.; GRIFT, T. E.; HANSEN, A. C. Effect of biodiesel on engine performances and emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 1098-1117, 2011.