

Leandro Maranghetti Lourenço

Desenvolvimento de método de determinação de glicerol livre em biodiesel utilizando a técnica de varredura sucessiva de potencial

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

**ARARAQUARA
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

L892d Lourenço, Leandro Maranghetti
Desenvolvimento de método de determinação de glicerol livre em biodiesel utilizando a técnica de varredura sucessiva de potencial / Leandro Maranghetti Lourenço. – Araraquara : [s.n], 2009
120 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Nelson Ramos Stradiotto


1. Eletroanalítica. 2 Biodiesel. 3. Glicerol. 4. Voltametria cíclica.
5. Controle de qualidade. I. Título.

LEANDRO MARANGHETTI LOURENÇO


Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Araraquara, 15 de julho de 2009.

BANCA EXAMINADORA



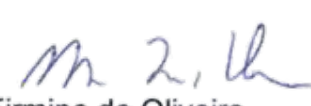
Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



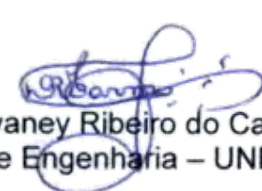
Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro
Instituto de Química de São Carlos – USP, São Carlos



Prof. Dr. Ernesto Chaves Pereira de Souza
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCAR, São Carlos



Prof. Dr. Marcelo Firmino de Oliveira
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. Devaney Ribeiro do Carmo
Faculdade de Engenharia – UNESP, Ilha Solteira

“A imaginação é mais importante que o conhecimento”

Albert Einstein

Dedico este trabalho à minha
esposa Silvana.

“A simplicidade é o último degrau da sabedoria”

Khalil Gibran

Aos meus pais, pelo apoio
e carinho em todos os momentos.

“Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez”

Jean Cocteau, artista francês

Ao Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto,
pela oportunidade e sábia orientação,
sempre com bom humor e responsabilidade.

Agradeço...

À minha irmã Gisele, pela constante ajuda nos acessos bibliográficos junto à Universidade de São Paulo e ao meu irmão Henri, pelo constante apoio e carinho.

À professora Mary Rosa Rodrigues de Marchi, pela valiosa ajuda com a parte de extração deste trabalho.

Aos meus amigos Paula Gonçalves Fenga e Magno Aparecido Gonçalves Trindade, pela constante ajuda nos momentos mais difíceis da pesquisa.

Aos alunos de doutorado que se foram, Leonardo Luiz Okumura, Patrícia Alves Carneiro e Adelir Aparecida Saczk, pela ajuda nos primeiros anos de adaptação.

Aos companheiros de dia a dia da pesquisa: Diana Maria Serafim, Michelle Fernanda Brugnera, Thiago Mescoloto Lizier, Michele de Souza Castilho e Elaine Renata de Castro Viana.

Um especial agradecimento à funcionária Cristina Aurora Bonelli Giollo e Valéria Aparecida Moreira Novelli pela preciosa ajuda com as referências bibliográficas.

Às funcionários da seção de pós-graduação, Sandra Regina Pavanelli, Patrícia Ribeiro de Mattos, Wennia Limonti de Souza e Célia Maria Chicareli pela constante ajuda.

Ao meu companheiro de república José Antônio de Moura, pelo precioso e inigualável tempo de convivência.

A todos aqueles de fora da UNESP-IQ, que contribuíram para o sucesso deste trabalho e seus frutos, entre estes, Cláudia Maria Cantarella Silva, Cynthia Maria de Campos Prado Manso, Devaney Ribeiro do Carmo e André Luís dos Santos.

Agradeço ao grupo TECPAR pela amostra de biodiesel cedida, bem como às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPESP.

A todos aqueles, que de forma direta e indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e alternativo ao óleo diesel, constituído por uma mistura de ésteres metílicos e/ou etílicos de ácidos graxos. É comumente obtido por meio da reação de transesterificação de triacilgliceróis, produzindo como subproduto o glicerol, considerado seu principal contaminante. A presença deste contaminante no biodiesel traz diversos inconvenientes que podem ocasionar baixo desempenho nos atuais motores e deterioração nos tanques de combustível. A determinação da qualidade do biodiesel é, portanto, de grande importância para aceitação e comercialização do biodiesel e de suas misturas com o diesel. Desta forma, o presente trabalho descreve o desenvolvimento de um método eletroanalítico rápido, sensível, barato e capaz de quantificar o glicerol livre em amostras de biodiesel tipo B100. Parâmetros como acidez, velocidade de varredura e número de ciclos sucessivos voltamétricos foram otimizados, possibilitando grande precisão e estabilidade ao método eletroanalítico desenvolvido. Um rápido método de extração foi desenvolvido, onde uma massa de 2 a 4 g de biodiesel (com precisão de 0,1 mg) é pesada em tubos de ensaio com posterior adição de 6 mL de água, seguida de etapas de agitação, separação de fase aquosa, purificação em cartuchos do tipo C18 e rotoevaporação. As condições eletroanalíticas empregadas foram: concentração analítica de ácido perclórico de 100 mmol L^{-1} , velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} e realização de 20 ciclos sucessivos voltamétricos entre os potenciais de -140 e 1300 mV *versus* Ag/AgCl_(sat). O método eletroanalítico desenvolvido mostra-se promissor, com um limite de detecção estimado de $2,3 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,5 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$) para o glicerol. Foi obtida uma excelente linearidade entre 15 e 150 mg L^{-1} (0,16 e $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso, que corresponde a uma faixa de trabalho de 56 a 560 mg kg^{-1} (glicerol:biodiesel) quando uma massa de 2 g de biodiesel é empregada na extração, apresentando, portanto, uma ampla faixa de trabalho com valores de concentração bem abaixo e acima dos máximos de concentração tolerados pelas agências reguladoras (200 mg kg^{-1}). Sob condições otimizadas, o método eletroanalítico desenvolvido permite a determinação de glicerol em um grande número de amostras sem a necessidade de recalibração. Desconsiderando os tempos de limpeza do eletrodo de platina, ativação e construção de curva analítica (ca. 75 min), que são realizados paralelamente aos procedimentos de extração, manuseio de amostras e determinações eletroquímicas, todo o procedimento desenvolvido consome, em triplicata, um tempo aproximado de 80 min.

Palavras-chave: Eletroanalítica. Glicerol. Biodiesel. Voltametria cíclica. Controle de qualidade.

ABSTRACT

Biodiesel is a renewable, biodegradable alternative to diesel consisting of a mixture of methyl and/or ethyl esters of fatty acids. It is usually produced from the transesterification reaction of triacylglycerols, and a by-product of this reaction is glycerol, the main contaminant of biodiesel. The presence of glycerol in biodiesel is inconvenient for a number of reasons: it may be responsible for the low performance of engines and deterioration of fuel tanks. Therefore, biodiesel quality control is of utmost importance for the commercialization of this fuel and its mixtures with diesel. In this sense, the present work describes the design of a fast, sensitive, inexpensive electroanalytical method for determination of free glycerol in biodiesel samples of the B100 type. Parameters such as acidity, scan rate, and number of successive voltammetric cycles were optimized, conferring large precision and stability to the designed electroanalytical method. A fast extraction method was also developed, in which 2 to 4 g of biodiesel (with a precision of 0.1 mg) is weighed in test tubes, with further addition of 6 mL of water, followed by stirring steps, aqueous phase separation, purification in cartridges of the C18 type, and rotaevaporation. The electroanalytical conditions employed in the analysis were: perchloric acid analytical concentration of 100 mmol L^{-1} , scan rate equal to 100 mV s^{-1} , and the performance of 20 successive voltammetric cycles between -140 and 1300 mV versus $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$. The designed electroanalytical method proved to be a promising analytical tool, with an estimated detection limit of 2.3 mg L^{-1} ($2.5 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$) for glycerol. An excellent linearity was obtained between 15 and 150 mg L^{-1} (0.16 and 1.6 mmol L^{-1}) in aqueous medium, which corresponds to a work range from 56 to 560 mg kg^{-1} (glycerol:biodiesel) when a mass of biodiesel of 2 g is employed in the extraction stage. This consists in a wide work range, which falls well below and above the concentrations established by the regulatory agencies (200 mg kg^{-1}). Under optimized conditions, the developed electroanalytical method allows glycerol determination in a large number of samples with no need for recalibration. Not taking the time necessary for platinum electrode cleansing and activation as well as analytical curve construction (*ca.* 75 min) into account, which are carried out in parallel with the extraction, sample handling and electrochemical determination procedures, the whole designed method takes, in triplicate, approximately 80 min.

Keywords: Electroanalytical. Glycerol. Biodiesel. Cyclic voltammetry. Quality control.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS	15
LISTA DE SÍMBOLOS	17
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 HISTÓRIA.....	21
1.2 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EM BIODIESEL.....	30
1.2.1 Métodos cromatográficos.....	33
1.2.2 Métodos espectroscópicos.....	42
1.2.3 Métodos espectrofotométricos.....	44
1.2.4 Outros métodos.....	47
1.3 GLICEROL.....	49
2 OBJETIVOS	56
3 MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES.....	57
3.2 PROCEDIMENTOS ELETROANALÍTICOS.....	58
3.3 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO.....	59
3.4 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE CONTROLE.....	60
3.4.1 Amostra de biodiesel isenta de glicerol.....	60
3.4.2 Amostra de biodiesel com concentração conhecida de glicerol.....	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DO GLICEROL.....	61
4.2 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE VARREDURA.....	68
4.3 ESTUDO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL.....	76
4.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	82
4.5 ESTUDO DE REPETITIVIDADE.....	88
4.6 CURVA ANALÍTICA.....	89
4.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE GLICEROL EM BIODIESEL.....	91
4.7.1 Teste de recuperação no processo de rotoevaporação.....	96
4.8 DETERMINAÇÃO DE GLICEROL LIVRE EM BIODIESEL.....	97
5 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS	100
ANEXOS	117

LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1 – Reação global de transesterificação (R_n = cadeia alquílica qualquer pertencente ao triacilglicerol, R' = cadeia alquílica pertencente ao álcool).....</p>	19
<p>Figura 2 – Folha de rosto da primeira patente de biodiesel.</p>	23
<p>Figura 3 – Número de publicações contendo a palavra biodiesel em seus 20 primeiros anos.....</p>	29
<p>Figura 4 – Reação de transesterificação (R_n = cadeia alquílica pertencente ao triacilglicerol, R' = cadeia alquílica pertencente ao álcool e cat = catalisador).....</p>	30
<p>Figura 5 – Voltamograma cíclico em eletrodo de platina ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 50$).</p>	63
<p>Figura 6 – Voltamograma cíclico em platina na ausência (- - -) e presença (—) de glicerol ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 1,54 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo}_{(\text{glicerol})} = 20$).</p>	65
<p>Figura 7 – Voltamogramas para estudos de velocidade de varredura ($a = 7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 400 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 2$).</p>	68
<p>Figura 8 – Efeito da variação da corrente de pico A em função de v e $v^{1/2}$ ($a = 7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 400 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 2$).</p>	70
<p>Figura 9 – Efeito da variação da corrente de pico D em função de v e $v^{1/2}$ ($a = 7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 400 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 2$)</p>	70
<p>Figura 10 – Voltamogramas para estudos de velocidade de varredura ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 500 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).</p>	71
<p>Figura 11 – Efeito da variação da corrente de pico A em função de $v^{1/2}$ ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 500 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).</p>	72

Figura 12 – Efeito da variação da corrente de pico D em função de $v^{1/2}$ ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 500 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).	73
Figura 13 – Voltamogramas para estudos de velocidade de varredura ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 500 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).	74
Figura 14 – Efeito da variação da corrente de pico A em função de $v^{1/2}$ ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 500 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).	75
Figura 15 – Efeito da variação da corrente de pico D em função de $v^{1/2}$ ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 500 \text{ mV s}^{-1}$; n° ciclo = 7).....	75
Figura 16 – Voltamogramas do efeito da concentração de glicerol ($a = 7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 - 70,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 3$).	76
Figura 17 – Efeito da corrente de pico anódica A com a concentração de glicerol ($a = 7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 - 70,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 3$).	78
Figura 18 – Efeito da corrente de pico anódica D com a concentração de glicerol ($a = 7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 - 70,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 3$).	78
Figura 19 – Efeito da corrente de pico anódica A com a concentração de glicerol ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 0,500 - 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).	79
Figura 20 – Efeito da corrente de pico anódica D com a concentração de glicerol ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 0,500 - 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).	80
Figura 21 – Efeito da corrente de pico anódica A e D com a concentração de glicerol ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 0,500 - 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).	81

- Figura 22 – Voltamogramas para estudos de estabilidade ($a = 0,125 \text{ cm}^2$;
 $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 1,08 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$;
 $n^\circ \text{ ciclo} = 10$; $t = 0 - 2 \text{ h}$).82
- Figura 23 – Voltamogramas para estudos de estabilidade ($a = 0,125 \text{ cm}^2$;
 $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 0,195 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$;
 $n^\circ \text{ ciclo} = 100$; $t = 0 - 14 \text{ h}$).83
- Figura 24 – Voltamogramas sucessivos ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$;
 $C_{\text{glicerol}} = 1,08 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; flechas indicam aumento
do n° de ciclos).....84
- Figura 25 – Influência do potencial limite na oxidação do glicerol ($a = 0,125 \text{ cm}^2$;
 $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 1,08 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$;
 $n^\circ \text{ ciclo} = 20$).87
- Figura 26 – Curva analítica obtida pelo registro das correntes de pico entre 400 e
800 mV *versus* Ag/AgCl_(sat) ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$;
 $C_{\text{glicerol}} = 1,96 \times 10^{-2} - 1,63 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 20$).89
- Figura 27 – Fluxograma indicando o processo de extração desenvolvido.95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Algumas propriedades do glicerol	50
Tabela 2 – Influência da velocidade de varredura de potencial nos principais parâmetros voltamétricos da oxidação do glicerol em HClO ₄ 100 mmol L ⁻¹	69
Tabela 3 – Influência da concentração de glicerol nos parâmetros voltamétricos em HClO ₄ 100 mmol L ⁻¹	77
Tabela 4 – Determinação das concentrações de glicerol após rotoevaporação	96
Tabela 5 – Determinação de glicerol livre em uma matriz com concentração conhecida de glicerol.....	97

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico
AG – Ácido(s) graxo(s)
AGL – Ácido(s) graxo(s) livre
ANP – Agência Nacional do Petróleo
APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica
ASTM – Sociedade Americana para Ensaios de Materiais
ATR – Reflexão Total Atenuada
BNDS – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
BSTFA – N,O-(bistrimetilsilil)trifluoroacetamida
CEIB – Comissão Executiva Interministerial
CEN – Comitê Europeu de Normalização
CETEC – Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais
COELCE – Companhia de Eletricidade do Ceará
COS – Correção de Sinal Ortogonal
CTA – Centro Técnico Aeroespacial do Ministério da Aeronáutica
DAD – Detector de Arranjo de Diodos
DG – Diacilglicerol(óis)
LD₅₀ – Dose Letal Mediana
ELSD – Detector Evaporativo de Espalhamento de Luz
Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI – Espectrometria de Massa por Ionização através de Eletronebulização
FID – Detector de Ionização de Chama
FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos
FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
FT-RAMAN – Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier
GC – Cromatografia Gasosa
GPC – Cromatografia de Permeação em Gel

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPSEC, SEC – Cromatografia de Alta Performance por Exclusão de Tamanho
IR – Infravermelho
ISO – Organização Internacional de Padronização
LC – Cromatografia Líquida
MG – Monoacilglicerol(óis)
MIMS – Espectroscopia de Massas por Introdução via Membrana
MS – Espectrometria de Massa
MSTFA – N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
NBR – Norma Brasileira de Regulamentação
NIR – Espectroscopia no Infravermelho Próximo
NMR – Ressonância Magnética Nuclear
NUTEC – Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará
PAD – Detector de Pulso Amperométrico
PCR – Método da Regressão do Componente Principal
Petrobrás – Petróleo brasileiro S.A.
PLS – Método dos Mínimos Quadrados Parciais
PNPB – Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
PROERG – Produtora de Sistemas Energéticos Ltda.
RAMAN – Espectroscopia Raman
RHE – Eletrodo Reversível de Hidrogênio
RID – Detector de Índice de Refração
RP – Fase Reversa
TAG – Triacilglicerol(óis)
THF – Tetraidrofurano
TLC – Cromatografia em Camada Delgada
TMS – Trimetilsilil derivados
UFC – Universidade Federal do Ceará
UNICAMP – Universidade de Campinas
UV – Ultravioleta
Vis – Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius (temperatura Celsius)
h	hora (tempo)
min	minuto (tempo)
s	segundo (tempo)
m	metro (comprimento)
g	grama (massa)
ppm	deslocamento em parte por milhão
t / t	triplete (espectroscopia) / tempo
s	singleto (espectroscopia)
Pa	pascal (pressão)
bar	bar (pressão)
mmHg	milímetro de mercúrio (pressão)
J	joule (trabalho, energia, quantidade de calor)
mol	mol (quantidade de matéria)
L	litro (volume)
V	volt (tensão elétrica)
A	ampère (corrente elétrica)
I	corrente elétrica
I_p	corrente de pico
E_p	potencial de pico
$E_{p1/2}$	potencial a meia altura do pico (valor de potencial onde $I = I_p/2$)
v	velocidade de varredura de potencial
a	área geométrica
r	coeficiente de correlação linear
C	concentração analítica
m	massa
rpm	rotações por minuto (frequência)
%m	porcentagem em massa - %(m/m)
pH	potencial hidrogeniônico

1 INTRODUÇÃO

O biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e alternativo ao óleo diesel, constituído por uma mistura de ésteres metílicos e/ou etílicos de ácidos graxos. É comumente obtido a partir da reação de um triacilglicerol (TAG: muitas vezes chamado triglicerídeo) com um álcool de cadeia curta (geralmente metanol ou etanol)¹, utilizando como catalisador uma base química (hidróxido de sódio ou potássio) ou, menos frequentemente, um ácido, tendo como subproduto o glicerol. A reação em questão é conhecida como transesterificação.

O TAG é um acilglicerol* que apresenta uma molécula de glicerol (propano-1,2,3-triol) esterificada a três ácidos graxos de cadeia longa. Formam a maior parte dos óleos e gorduras e estão disponíveis em diversas matérias-primas, incluindo a maioria dos óleos vegetais (óleo de soja, palma, amendoim, colza/canola, girassol, açafrão, coco, caroço de algodão, milho, mamona, babaçu, entre outros) e gorduras de origem animal (usualmente sebo), bem como óleos de descarte (óleo de frituras).

Na reação de transesterificação (Figura 1), os TAG são convertidos a ésteres de ácidos graxos (AG), que poderão ser ésteres metílicos (se utilizado metanol como reagente), ésteres etílicos (se etanol), ésteres propílicos ou outros ésteres de AG.

* **Acilglicerol:** Composto formado por 1 a 3 moléculas de ácidos graxos esterificados ao glicerol, formando mono-, di- ou triacilglicerol (mono, di ou triglicerídeo).

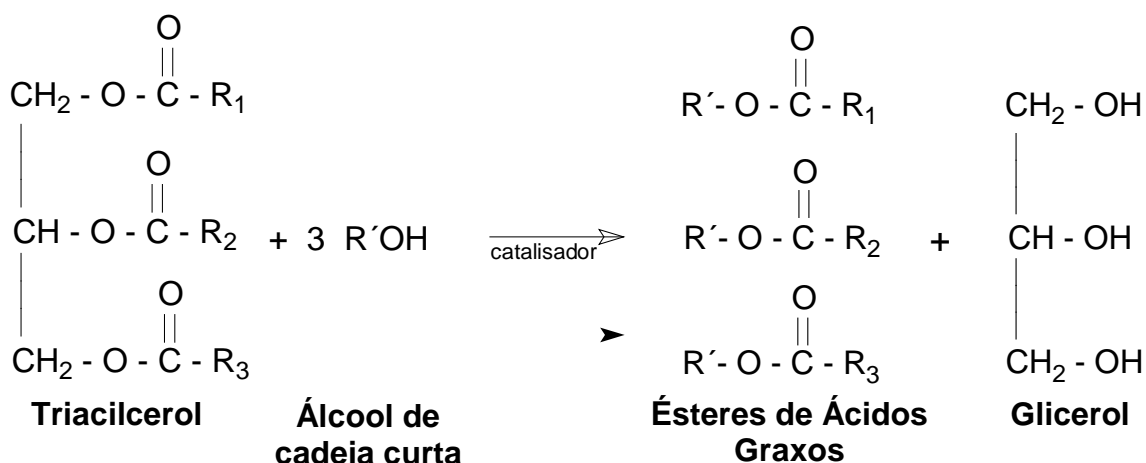


Figura 1 – Reação global de transesterificação (R_n = cadeia alquílica qualquer pertencente ao triacilglicerol, R' = cadeia alquílica pertencente ao álcool).

Respeitadas as condições de qualidade das agências reguladoras, a mistura de ésteres de AG obtida pode ser comercializada com o nome de biodiesel.

O biodiesel apresenta propriedades semelhantes ao óleo diesel do petróleo, sendo inclusive miscível a ele. Este é um dos principais atrativos deste combustível, o que permite sua utilização como combustível alternativo, além de poder ser utilizado na forma de uma mistura binária com o diesel. Estas misturas, por sua vez, não podem ser denominadas de biodiesel, sendo designadas por acrônimos como B5, onde a letra B, do inglês *blend*, indica que a mistura em questão possui 5% de biodiesel diluído ao diesel do petróleo. De forma semelhante, as misturas do diesel com óleos vegetais *in natura* não podem ser denominadas de biodiesel.

Razões econômicas, ambientais e sociais cercam a utilização do biodiesel como combustível². Do ponto de vista econômico, sua utilização está ligada diretamente à redução das importações do óleo diesel, o que gera divisas ao país. Pelo lado ambiental, a utilização de *blends* possibilita uma diminuição nas principais emissões presentes nos gases de exaustão (com exceção dos óxidos de nitrogênio, NO_x)³, diminuindo também as emissões de SO_2 (biodiesel possui baixo teor de enxofre) e, por ser um combustível basicamente oriundo de fontes renováveis, uma boa parte do gás carbônico produzido pela sua queima é constituída de “carbono neutro”.

Pelo lado automotivo, possui um alto ponto de fulgor[†], o que confere a este combustível um manuseio e armazenamento mais seguro. Outra vantagem está em sua alta lubricidade, que é um atrativo quando o biodiesel é utilizado como aditivo ao petrodiesel de baixo teor de enxofre, tendo em vista que este tem sua lubricidade reduzida durante seu processo de produção.

Pela parte social, a larga utilização de óleos vegetais como matéria-prima à produção de combustíveis está ligada à geração de emprego no campo, principalmente em regiões pouco privilegiadas, além de propiciar uma maior oferta de insumos para a indústria de alimentos e ração animal^{2,4}.

Como desvantagem, a produção do biodiesel envolve altos custos inerentes ao seu próprio processo de produção, que são amenizados por legislações específicas, marcos regulatórios ou subsídios na forma de isenção fiscal. Outra desvantagem está em sua baixa estabilidade à oxidação quando exposto ao ar, além de que suas propriedades de fluxo são desfavoráveis em baixas temperaturas.

[†] **Ponto de fulgor (*flash point*):** Também chamado de ponto de inflamação, é a menor temperatura na qual uma substância, como por exemplo um combustível, produz vapores em quantidade suficiente para flamejar ou queimar momentaneamente quando na presença de uma fonte de ignição.

1.1 História

As pesquisas acerca da utilização de óleos vegetais e seus derivados em motores do ciclo diesel iniciaram-se muito tempo antes da crise do desabastecimento de petróleo ocorrida entre 1970 e primeiros anos de 1980.

Por volta do fim do século XIX, Rudolf Diesel (1858-1913), inventor da máquina que veio a receber seu nome, fez um relato em seu livro intitulado “*Die Entstehung des Dieselmotors*” (O Surgimento das Máquinas Diesel)⁵ sobre a utilização de óleo de amendoim em seus motores. No capítulo “Combustíveis Líquidos” deste livro, Diesel menciona:

[...] Para completar, é importante que, nos idos de 1900, óleos vegetais já vinham sendo utilizados em máquinas diesel com sucesso. Durante a Exposição de Paris de 1900, a companhia francesa Otto demonstrou o funcionamento de um pequeno motor diesel com óleo de amendoim. Esta experiência foi tão bem sucedida que apenas alguns dos presentes perceberam as circunstâncias em que a mesma havia sido conduzida. O motor, que havia sido construído para consumir petróleo, operou com óleos vegetais sem qualquer modificação. Também foi observado que o consumo de óleo vegetal resultou em um aproveitamento do calor literalmente idêntico ao do petróleo.⁶

Em uma biografia de Diesel⁷ redigida por seu filho, é relatado que cinco motores foram exibidos na Exposição de Paris e que, pelo menos um, foi aparentemente abastecido com óleo de amendoim.

Em outra biografia de Diesel, intitulada “*Rudolf Diesel, Pioneer of the Age of Power*” de Nitske e Wilson⁸, o evento ocorrido na Exposição de Paris de 1900 é confirmado, porém, há uma contradição acerca do tipo de motor utilizado para operar com o óleo de amendoim (motor diesel ou outro motor específico para óleo vegetal), dando margem à hipótese de que não foi Rudolf Diesel quem conduziu os experimentos e que, possivelmente, também não foi ele quem concebeu a ideia de empregar óleos vegetais como combustível para seus motores. Alguns anos mais tarde, o próprio Diesel admitiu que a ideia do uso de óleo de amendoim partiu do governo francês, porém, confirmou que os testes tinham sido elaborados em seus motores^{9,10}, afirmando que:

[...] na Exposição de Paris de 1900, a companhia Otto apresentou um pequeno motor diesel que, por solicitação do governo francês, foi operado com óleo de amendoim e funcionou tão bem que poucas pessoas se aperceberam do experimento. O motor, que foi construído para consumir óleo mineral, foi alimentado e operou com óleo vegetal, sem que tivesse sofrido qualquer modificação técnica⁶.

Na época, o interesse neste combustível por parte do governo francês esteve ligado à autossuficiência energética de suas colônias africanas, pois o amendoim poderia ser facilmente cultivado por elas. A partir daí, segundo os próprios relatos de Diesel, foi utilizado em São Petersburgo óleo de mamona e óleos animais, que apresentaram excelentes resultados como óleo combustível em locomotivas.

A possibilidade de utilização de óleos vegetais sem a necessidade técnica de modificação nos motores a diesel foi investigada nos anos seguintes pelos países europeus que possuíam colônias africanas, como França, Bélgica, Itália e Reino Unido, com exceção de Portugal.

Durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), a utilização de óleos vegetais em substituição ao diesel mostrou-se bastante atraente, forçando países como o Brasil, que na época também investigavam a utilização de óleos vegetais como combustível, que proibissem a exportação de óleo de algodão¹¹. Nesta época, a China investiu no processo de craqueamento para a produção de querosene e gasolina a partir de óleo de tungue e outros óleos vegetais^{12,13}. No Brasil, a rota de craqueamento também foi investigada nesta época¹⁴, bem como estudos em 14 diferentes espécies oleaginosas para utilização do óleo *in natura* como combustível¹⁵. Na Índia, teve-se notícia também que 11 óleos de origem vegetal (amendoim, caroço de algodão, colza, coco, gergelim, *karanj*, *kapok*, *punnal*, *polang*, mamona e *mahua*) foram testados¹⁶.

É importante observar que há muitos estudos acerca da utilização de óleos vegetais *in natura* neste período de grande turbulência internacional. Pouca atenção, apesar de alguns trabalhos publicados, foi dada aos testes que envolviam mistura de combustíveis. Entre estes, temos a mistura do diesel de petróleo com óleo de algodão^{17,18}, óleo de milho¹⁹, óleo de nabo, girassol, linhaça, amendoim e algodão²⁰. A mistura de etanol hidratado com gasolina também foi investigada neste período de guerra²¹ bem como a possibilidade de utilização de óleos vegetais como lubrificantes

nas colônias francesas da África²², o que rendeu diversas patentes sobre o assunto, particularmente para processos de craqueamento e pirólise²³⁻²⁹.

Assim que os conflitos armados cessaram, o preço do barril de petróleo voltou a atingir valores mais acessíveis ao mercado³⁰, porém, pesquisas envolvendo a utilização de óleos vegetais *in natura* em motores diesel continuaram em diversos países. Nos Estados Unidos, a utilização de óleo de caroço de algodão¹⁷ e milho¹⁹ foram motivos de diversas pesquisas, bem como as de misturas de diesel com estes óleos vegetais, denominadas de *blends*. A ideia naquele momento, era buscar combustíveis alternativos e viáveis caso um novo desabastecimento mundial pudesse ocorrer.

Alguns anos antes da Segunda Guerra Mundial, trabalhos importantes sobre este tema foram realizados na Bélgica e em sua antiga colônia Congo Belga (posteriormente chamada de Zaire e atualmente República Democrática do Congo). Tais trabalhos renderam ao seu pesquisador, Charles Georges Chavanne, em 1937, o título atual de “inventor do biodiesel”. A patente belga³¹ (*brevet d'invention*) intitulada “*Procédé de transformation d'huiles végétales en vue de leur utilisation comme carburants*” (método de transformação de óleos vegetais com o propósito da sua utilização como combustíveis) descreve em seu resumo que uma mistura de AG e seus glicerídeos foi tratada na presença de um catalisador e alcoóis de baixo peso molecular, a fim de convertê-los nos ésteres que podem ser usados como combustível líquido (Figura 2).

A patente descreve claramente a reação de transesterificação do óleo de palma (oriundo da colônia Congo Belga) com álcool etílico na presença de catalisadores ácidos. Mais precisamente, em sua página 4, há um detalhamento desta reação, onde é mostrada a utilização de etanol e também metanol para se produzirem ésteres metílicos ou etílicos e, como catalisador, menciona

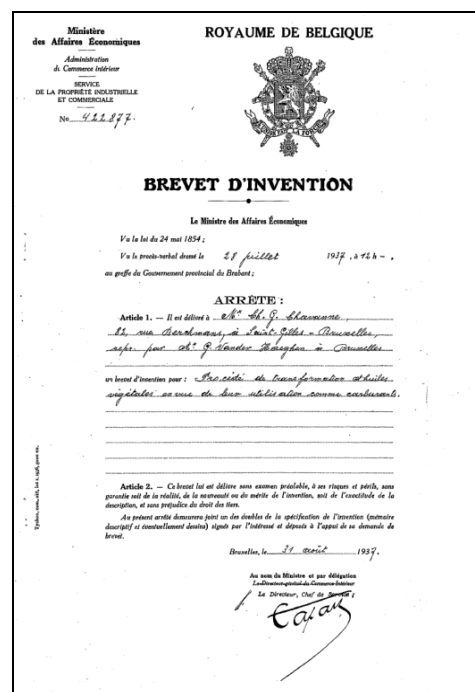


Figura 2 – Folha de rosto da primeira patente de biodiesel.

o uso de ácidos fortes, tais como clorídrico, sulfúrico e sulfônico, não havendo qualquer menção a catalisadores básicos nesta patente. Outros detalhes sobre esta pesquisa foram publicados também em 1944³².

Em 1942, foi publicado um importante e extenso relatório técnico³³ acerca da produção e uso destes ésteres etílicos de óleo de palma como combustível. O relatório descreve testes em um ônibus de uma linha comercial que realizava o trajeto entre Bruxelas (neerlandês: *Brussel*; francês: *Bruxelles*) e Lovaina (neerlandês: *Leuven*) durante o verão de 1938. A distância aproximada entre estas cidades é de 30 km.

Em uma busca por artigos científicos acerca da utilização de óleos vegetais transesterificados para fins combustíveis em motores do ciclo diesel no *Chemical Abstract*, por meio do programa *SciFinder Scholar*, não foram encontradas referências ou trabalhos que continuassem ou repetissem a rota de transesterificação para a produção de combustível. Sendo assim, o trabalho de Chavanne ficou praticamente esquecido. De forma quase semelhante, poucos trabalhos continuaram a tendência de se substituir óleo diesel por óleos vegetais *in natura* para motores do ciclo diesel^{34,35}.

Somente em 1981, após quase 44 anos da primeira patente daquilo que se entende hoje como “biodiesel”, foram encontrados dois relatos de combustíveis para motores do ciclo diesel que também utilizavam da rota de transesterificação. Trata-se de duas patentes brasileiras de Exedito José de Sá Parente, sendo a primeira, identificada por BR 8004358³⁶, intitulada “processo de produção de um combustível sucedâneo de óleo tipo diesel” e a segunda, identificada por BR 8007957 intitulada “Processo de produção de combustíveis a partir de frutos ou sementes oleaginosas”³⁷. A primeira descreve a rota de transesterificação para a produção de ésteres metílicos (ou etílicos) na presença de catalisadores alcalinos e com excesso de álcool (metílico ou etílico). Na época, este combustível foi chamado, segundo o resumo da patente, de “combustível diesel sintético”. A outra patente também trata da produção de ésteres de AG por meio da reação de transesterificação, descrevendo a catálise ácida além da básica.

Segundo relatos de Parente², o PRODIESEL (nome dado ao biodiesel pelo autor) foi lançado no Brasil após a realização de inúmeros testes de aplicabilidade

entre 1979 e 1980 pela Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC), pelo Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, pelo Departamento de Transporte da Companhia de Eletricidade do Ceará (COELCE) e pelo Centro Técnico Aeroespacial do Ministério da Aeronáutica (CTA). Parente² relata ainda que ao longo do segundo semestre de 1981 e durante quase todo o ano de 1982, foram remetidos aos fabricantes de motores diesel cerca de 300 mil litros de PRODIESEL e que, inclusive, para agilizar as fabricações sistemáticas do novo combustível, foi criada uma empresa que se estabeleceu em Fortaleza, cuja razão social era Produtora de Sistemas Energéticos Ltda. (PROERG), que implantou uma unidade piloto industrial financiada pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), com apoio também do Ministério da Aeronáutica. Esta unidade piloto contava com uma capacidade produtiva de 200 litros por hora deste combustível.

Em resposta ao desabastecimento de petróleo, por volta de 1983, durante o Governo Figueiredo (1979-1985) e, motivados pelo sucesso do PRÓ-ÁLCOOL dos anos anteriores³⁸, houve uma tentativa de implantação de um programa chamado Plano de Produção de Óleos Vegetais Para Fins Carburantes (PRÓ-ÓLEO), elaborado pela Comissão Nacional de Energia, por meio da Resolução nº 7, de 22 de outubro de 1980³⁹. Este programa contou com esforços do então vice-presidente Aureliano Chaves além de diversos pesquisadores, entre eles, Ulf Schuchardt⁴⁰ do Instituto de Química na Universidade de Campinas (UNICAMP). O plano previa a regulamentação de uma mistura contendo 30% de óleo vegetal *in natura* ou derivados no diesel, que poderia vir a substituir o diesel puro em longo prazo⁴¹. Como alternativa tecnológica, os pesquisadores brasileiros sugeriram na época que fosse realizada a transesterificação ou alcoólise de óleos vegetais e/ou gorduras animais. Neste momento, merecem créditos os estudos da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC)³⁹, em parceria com o Ministério da Indústria e Comércio, da Universidade Federal do Ceará (UFC)², e da UNICAMP⁴². Entretanto, com a queda no preço do barril de petróleo, este programa foi abandonado em 1986.

Sendo assim, os primeiros anos de 1980 foram marcados pela reutilização ou “redescoberta” da rota de transesterificação para a produção de combustíveis para motores do ciclo diesel. Curiosamente, uma busca no *Chemical Abstract* por

combustíveis derivados de óleos vegetais usando a rota de transesterificação forneceu, após as patentes de Parente^{36,37}, quatro outras patentes⁴³⁻⁴⁶ também brasileiras, mostrando o grande engajamento técnico-científico e político do Brasil naqueles anos.

No final do século XX, o iminente aumento do preço do barril de petróleo além da grande preocupação da mídia internacional acerca dos problemas ambientais (momento pós-Protocolo de Quioto) motivou os governos a investirem novamente em combustíveis alternativos. Neste momento, o governo brasileiro voltou a discutir a introdução do biodiesel em sua matriz energética e, em 2002, ficou decidido que os combustíveis derivados da etanolise de óleos vegetais seriam os principais substitutos ao diesel do petróleo⁴¹. O programa foi batizado com a Portaria MCT nº 702, de 30 de outubro de 2002 como PROBIODIESEL. Este programa previa a substituição até 2005 de todo o óleo diesel consumido no Brasil por uma mistura contendo 5% de biodiesel, denominada B5 (5% biodiesel e 95% diesel) e, em 15 anos, pela mistura B20⁴⁷.

Em 2 de Julho de 2003, um decreto presidencial criou o “Grupo de Trabalho Interministerial – Biodiesel”, cujo objetivo era “apresentar estudos sobre a viabilidade de utilização de óleo vegetal – biodiesel como fonte alternativa de energia, propondo, caso necessário, as ações necessárias para o uso do biodiesel”⁴⁸. No relatório final deste grupo de 4 de dezembro de 2003⁴⁸, foi recomendado na seção 6.2 a introdução imediata do biodiesel na agenda oficial do governo, além de diversas outras recomendações de caráter social, econômico, além de testes que visavam a qualidade deste combustível entre outras propostas. A fim de dar execução a estas recomendações, foi criado por meio do Decreto Presidencial de 23 de dezembro de 2003, a Comissão Executiva Interministerial (CEIB), composta por 14 ministérios e coordenada pela Casa Civil. Esta comissão possui como unidade executiva um grupo gestor que conta com representantes de dez ministérios além de membros da Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (Embrapa), Agência Nacional do Petróleo (ANP), Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDS) e Petróleo brasileiro S.A. (Petrobrás), coordenada pelo Ministério de Minas e Energia.

Ao longo do ano de 2004, diversas medidas provisórias foram publicadas para garantir a legitimidade do biodiesel, destacando-se a Medida Provisória nº 214, de 13 de setembro de 2004. Esta, definia o biodiesel como: “combustível para motores a

combustão interna com ignição por compressão, renovável e biodegradável, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil.”

No final de 2004, no dia 4 de dezembro, foi lançado o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB)⁴⁹ em sessão solene no Palácio do Planalto. Este programa teve como objetivo a implementação de forma sustentável, técnica e econômica da produção e uso do biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, via geração de emprego e renda. Cinco dias após este evento, foi publicado no Diário Oficial da União, de 9 de dezembro de 2004, dezenove resoluções (resolução nº 23 a 42) que formalizaram todos os esforços do PNPB ao longo do ano de 2004 e que propiciou a formulação da Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005 (“Lei do biodiesel”)⁵⁰. Esta lei determinou um percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel em 5% em volume, para ser alcançado em oito anos, sendo que três anos seria o prazo limite para a utilização de um percentual mínimo obrigatório intermediário de 2% em volume. Em outras palavras, o uso do combustível B2 era opcional até 2008, passando a ser obrigatório a partir desta data e, entre 2008 e 2013, além da obrigatoriedade do B2, misturas de até 5% (B5) de biodiesel podem ser utilizadas até 2013, quando passarão a ser obrigatórias.

Ficou definido nesta lei que biocombustível é um “combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”. A lei contou também com uma definição de biodiesel, sendo um “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”⁵⁰.

As normas utilizadas na determinação das características do biodiesel tipo B100 foram especificadas na Resolução nº 42, de 24 de novembro de 2004⁵¹. Esta Resolução, em seu anexo A, trazia o regulamento técnico nº 4, que dizia que as normas a serem seguidas seriam as da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT),

Sociedade Americana para Ensaio de Materiais (ASTM), Organização Internacional de Padronização (ISO) e as do Comitê Europeu de Normalização (CEN).

Naquele momento, a ABNT não havia indicado métodos específicos para determinação de alguns contaminantes, fato que produziu um regulamento técnico com valores incompletos para a coluna ABNT NBR. Estes limites foram inseridos apenas após a Resolução nº 7 de 19 de março de 2008 ⁵², que veio a substituir a antiga resolução nº 42. Em seu anexo (ver ANEXOS A, B, C e D), a nova resolução traz o regulamento técnico ANP nº1/2008, que estabelece os critérios técnicos de qualidade do biodiesel, orientando novamente o uso das normas da ABNT além de indicar as normas ASTM, EN/ISO e respectivos métodos para cada contaminante específico.

Até o presente momento, as pesquisas em biodiesel vêm ganhando força no cenário mundial, estimuladas principalmente pela alta no preço do barril do petróleo e pela grande pressão da mídia internacional acerca dos problemas ambientais. Uma busca pela palavra “biodiesel” no *Chemical Abstract* por meio do programa *SciFinder Scholar* revelou que o primeiro uso da palavra “biodiesel” na literatura técnico-científica deve ser creditado a um trabalho chinês publicado em 1988 ⁵³. O próximo artigo que empregou este termo foi publicado em 1991 ⁵⁴ e, a partir deste momento, as ocorrências para a palavra “biodiesel” aumentaram exponencialmente na literatura internacional, como pode ser visto na Figura 3.

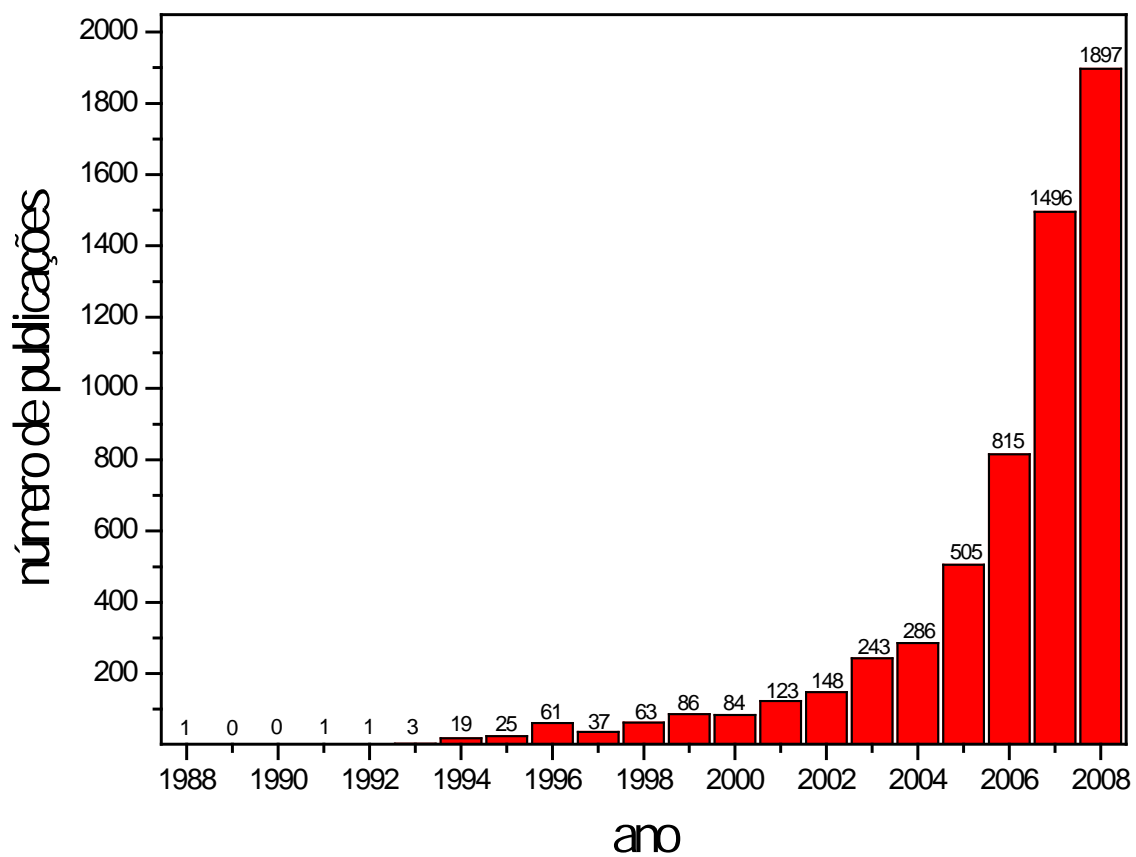


Figura 3 – Número de publicações contendo a palavra biodiesel em seus 20 primeiros anos.

1.2 Métodos analíticos para determinação de contaminantes em biodiesel

A conversão completa dos TAG em ésteres de AG envolve três passos consecutivos^{55,56}, sendo diacilgliceróis (DG) e monoacilgliceróis (MG) os intermediários desta reação, conforme visto na Figura 4.

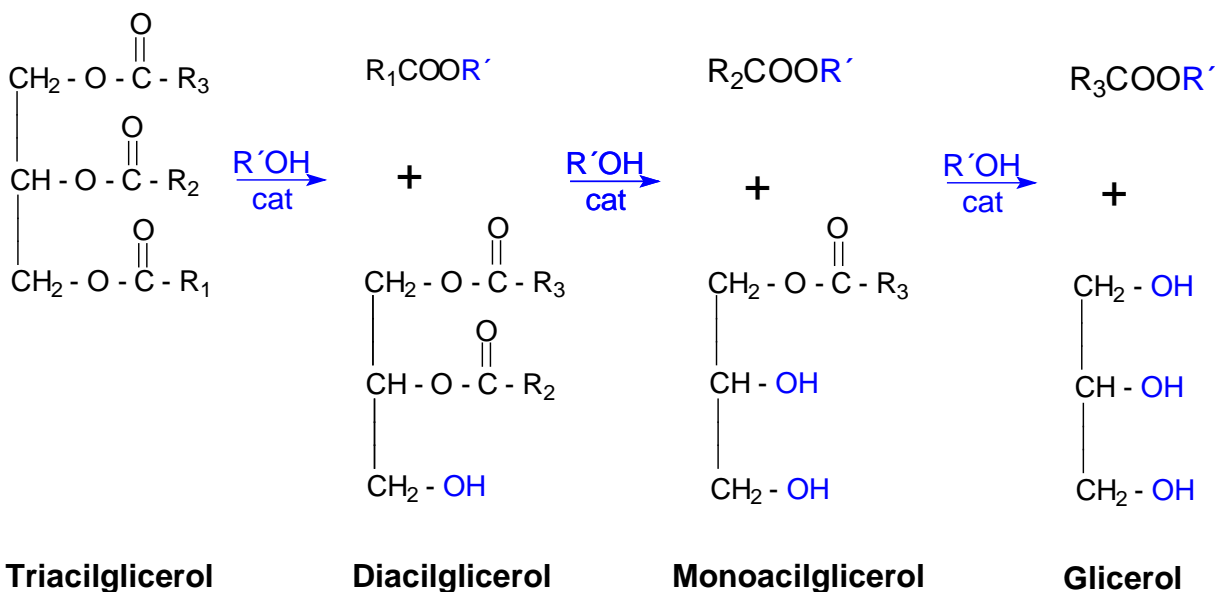


Figura 4 – Reação de transesterificação (R_n = cadeia alquílica pertencente ao triacilglicerol, R' = cadeia alquílica pertencente ao álcool e cat = catalisador).

Muitos fatores afetam a reação de transesterificação, como a estequiometria entre óleo e álcool, o tipo de álcool, natureza e quantidade de catalisador, tempo de reação, temperatura e pureza dos reagentes, com atenção à quantidade de água presente no óleo e seu teor de ácidos graxos livres (AGL)⁵⁷.

Durante o processo de transesterificação, MG e DG são formados, permanecendo quantidades apreciáveis destes após o término da reação. Junto com estes, pode ainda permanecer TAG não reagidos, resíduo de glicerol, AG livres, álcool residual (oriundo dos reagentes), resíduo de catalisador ou até mesmo sabão, fruto de uma reação indesejada.

Com o término da reação de transesterificação e posterior repouso, tem-se a formação de duas fases: uma menos densa, chamada de fase orgânica, constituída em sua maioria por ésteres de AG e algumas impurezas orgânicas, e uma mais densa, contendo glicerol (subproduto) e outros componentes residuais. Após o processo de separação, a fase orgânica é purificada por meio de várias lavagens com água a fim de eliminar glicerol e outras impurezas indesejáveis. Todavia, pequenas quantidades de glicerol ainda permanecem nesta fase, sendo estimada uma solubilidade ao redor de 200 mg kg^{-1} a $0 \text{ }^\circ\text{C}$, podendo alcançar valores entre 300 e 500 mg kg^{-1} devido à fácil dispersão do glicerol nestes ésteres. Como agravante, a presença de sabões na fase orgânica pode ainda influenciar na concentração de glicerol livre, permitindo uma solubilidade de glicerol muito maior⁵⁸.

É sabido que a presença de glicerol no biodiesel traz diversos inconvenientes, tais como baixo desempenho nos atuais motores⁵⁹, deterioração dos tanques de combustíveis ou um possível aumento nas emissões de acroleína^{60,61}, que pode ocorrer em uma queima a temperaturas acima de $180 \text{ }^\circ\text{C}$ ⁶². Um biodiesel com baixos teores de glicerol é alcançado com o uso de catalisadores adequados ou por meio da destilação⁵⁹. No entanto, algumas amostras destiladas de biodiesel podem conter glicerol livre destilado como produto principal desta operação unitária⁵⁸.

De forma semelhante, a presença do contaminante metanol no biodiesel, traz problemas relativos à corrosão, particularmente do alumínio, decréscimo no ponto de fulgor, além de oferecer riscos à segurança⁶³.

A determinação da quantidade de água no biodiesel também é um indicador importante de sua qualidade, uma vez que esta pode ocasionar diversos problemas, tais como desenvolvimento de atividade biológica, além da corrosão em tanques de combustíveis, formação de emulsões e causar hidrólise ou oxidação hidrolítica do combustível.

Desta forma, um controle rigoroso na qualidade do biodiesel torna-se necessário a fim de garantir aceitabilidade e conseqüentemente um maior sucesso na comercialização deste produto e seus *blends*⁶⁴.

Os critérios de qualidade de biodiesel são definidos na Europa pela norma EN 14214 e nos Estados Unidos pela ASTM D6751. No Brasil, as normas utilizadas

para determinação das características do biodiesel tipo B100 (biodiesel puro) estão especificadas na Resolução nº 7, de 19 de março de 2008⁵². Esta Resolução traz em seu anexo o regulamento técnico nº 1/2008, que diz que as normas a serem seguidas são as da ABNT, em conformidade com a ASTM, ISO e CEN.

As normas de controle de qualidade de biodiesel delimitam valores para contaminantes individuais, tais como glicerina livre[‡] e glicerina total[§], para os teores de glicerol e acilgliceróis respectivamente, ponto de fulgor para a quantidade de álcool residual (metanol ou etanol), acidez para limitar a quantidade de AGL e teor de cinzas para limitar resíduos de catalisador.

É importante saber que não é necessário que alguns contaminantes sejam quantificados de forma precisa, mas sim na forma de classe de compostos. Um exemplo está na classificação glicerina total, que se refere à quantidade de MG, DG ou TAG sem a preocupação de qual(is) tipo(s) de ácido(s) graxo(s) está(ão) esterificado(s) à molécula de glicerol. Esta postura se deve essencialmente à forma como os primeiros testes em biodiesel foram estabelecidos, que tiveram como base a técnica de cromatografia gasosa (GC).

Pesquisas que buscam o desenvolvimento de novas técnicas analíticas que sejam rápidas, precisas e de baixo custo para o controle da qualidade do biodiesel são de fundamental importância. A princípio, um método utilizado deve ser adequado para a análise de combustíveis oriundos de qualquer matéria-prima, mas nem sempre este quesito é preenchido, o que exige a combinação de dois ou mais métodos para o controle de qualidade.

Dentre as categorias de procedimentos analíticos para a determinação de contaminantes em biodiesel, os cromatográficos e espectrofotométricos se destacam. Os cromatográficos mais utilizados são a GC e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Na literatura, alguns autores empregam a união de duas ou mais categorias, que se tornaram comuns com o advento das técnicas hífenadas, tais como a GC acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), a GC acoplada à espectrometria no infravermelho (GC-IR), a cromatografia de fase líquida (LC) acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), entre outras.

[‡] **Glicerina livre:** Também chamado de glicerol livre, refere-se à substância glicerol como contaminante.

[§] **Glicerina total:** Refere-se à quantidade de glicerol livre + acilgliceróis.

Na análise de contaminantes em biodiesel, Knothe⁶⁵ e Mittelbach⁵⁹ declararam que a quantidade de glicerol e glicerídeos representa o fator de maior importância na qualidade do biodiesel.

Alguns métodos não serão tratados nas seções seguintes, como aqueles desenvolvidos para a determinação de contaminantes inorgânicos em biodiesel⁶⁶⁻⁷³ (P, Na, K, Ca, Mg, Cl e S), métodos que se baseiam nas propriedades físicas⁶⁴ dos combustíveis além dos métodos que investigam o teor de biodiesel e/ou TAG em diesel⁷⁴⁻⁸⁹ (*blends*).

Até o presente momento, há na literatura três revisões que tratam sobre os métodos para a determinação da qualidade do biodiesel^{64,90,91} que serviram de base para esta revisão bibliográfica.

1.2.1 Métodos cromatográficos

Os métodos propostos na literatura que se utilizam das técnicas de GC e HPLC para a determinação da qualidade do biodiesel foram originalmente desenvolvidos para ésteres metílicos de AG⁹⁰, o que excluiu os chamados ésteres superiores, entre estes, os ésteres etílicos e isopropílicos de AG. Algumas modificações devem ser feitas (programação de diversos parâmetros como temperatura, vazão, tempo, etc) para que ésteres superiores sejam analisados, porém, isso não impede ainda que, pela GC, tais ésteres sejam determinados como uma classe de compostos. Para a HPLC, as análises podem ser feitas sem maiores problemas para os demais ésteres, entre estes, ésteres etílicos, isopropílicos e isobutílicos de AG oriundos de óleo de soja e de sebo bovino⁹².

A cromatografia em camada delgada com detecção de ionização de chama (TLC-FID) foi a primeira técnica utilizada para analisar misturas de ésteres contendo TAG, DG e MG, obtidos pela transesterificação de óleos vegetais⁹³. Os autores utilizaram o álcool estearílico (octodecanol) como padrão interno. Alguns anos mais tarde, esta mesma técnica foi utilizada para a avaliação da taxa de conversão de óleos em ésteres metílicos de ácidos graxos juntamente com a GC⁹⁴. A grande

vantagem desta técnica estava em seu reduzido tempo de análise, permitindo analisar até trinta amostras em um tempo de 2 a 3 h. Posteriormente, esta técnica foi abandonada devido à baixa precisão, grande sensibilidade à água (interferente)⁹³ e ao seu alto custo de instrumentação⁹⁴.

Nos trabalhos de GC em biodiesel, muitos deles empregam detecção por ionização de chama (FID), embora o uso de detectores baseados em espectrometria de massa (MS) possa eliminar qualquer ambiguidade a respeito dos compostos a serem detectados, porém, sua quantificação pode ser dificultada⁹¹. Até o momento, a GC é a técnica mais utilizada para as análises em biodiesel devido à sua alta precisão em quantificar componentes minoritários⁶. Por outro lado, esta precisão fica comprometida por diversos fatores como o desvio da linha de base, superposição de sinais e envelhecimento de padrões e amostras^{6,91}.

Normalmente as análises são feitas em concentrações muito baixas e na presença de um solvente orgânico. Para amostras de biodiesel, a GC pode ser utilizada na determinação de ésteres metílicos, porém, a mesma apresenta inconvenientes para a análise de acilgliceróis não voláteis, sendo geralmente necessária a derivação** ou acetilação das hidroxilas livres dos MG, DG ou TAG. A derivação consiste no tratamento de uma amostra de tal forma a torná-la “mais volátil”. O glicerol, AGL, alcoóis residuais, MG e DG⁹⁵ podem ser derivados pelo agente silano N,O-(bistrimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA)⁹⁶. Este reagente converte os grupos hidroxila em trimetilsilil-derivados (TMS) que, além de serem mais voláteis, permitem uma interpretação mais fácil dos resultados quando a GC estiver acoplada à MS (GC-MS). Embora este procedimento melhore a separação cromatográfica, este traz como inconveniente um aumento no tempo de análise⁹¹. Atualmente, os derivados voláteis de AG⁹⁷ são considerados a base atual dos métodos cromatográficos para a determinação de contaminantes em GC.

O primeiro trabalho que utilizou a técnica de GC na análise da qualidade de biodiesel fez uso do reagente BSTFA⁹⁸. Este trabalho teve como objetivo a quantificação de ésteres metílicos totais, bem como MG, DG e TAG obtidos da transesterificação do óleo de soja. Neste trabalho, o autor utilizou uma coluna de 1,8 m

** **Derivação:** Conhecida também como derivatização por alguns autores, do inglês *derivatization*.

de sílica fundida (100% dimetilpolisiloxano) e tricaprina^{††} como padrão interno. A separação completa de acilgliceróis e ésteres foi obtida em um tempo de corrida de apenas 12 min. Este procedimento foi adotado para os trabalhos subsequentes que visavam a quantificação de ésteres totais e contaminantes presentes no biodiesel. Em um trabalho semelhante, a análise de ésteres etílicos oriundos de óleo de colza bem como a taxa de conversão de acilgliceróis em ésteres foi realizada em um equipamento de GC acoplado a FID em uma coluna de 1,8 m x 4 mm^{99,100}. Em determinações de acilgliceróis em biodiesel, outros autores realizaram procedimentos semelhantes^{101,102}, porém, com algumas modificações, utilizando uma coluna de (5% fenil)-metilpolisiloxano e diferentes parâmetros como comprimento da coluna, programação de temperatura além de outros padrões internos.

A necessidade de derivação foi contornada por Li e colaboradores¹⁰³ ao desenvolverem um método simples e rápido, baseado na GC-FID para a quantificação de ésteres metílicos de AG e acilgliceróis no biodiesel. Este procedimento foi possível devido ao uso de uma coluna não polar aquecida a altas temperaturas. Seguindo esta mesma tendência, outro trabalho¹⁰⁴ descreve a análise qualitativa e quantitativa de ésteres metílicos de AG em biodiesel por meio de uma coluna capilar polar (J&W INOVAX) utilizando também GC-FID. Como inconveniente, este método requer o uso de diversos padrões de ésteres de AG.

De uma forma geral, os trabalhos de GC tratam da análise de contaminantes como uma classe de compostos, porém, há métodos desenvolvidos para a determinação de um contaminante específico, como o glicerol livre^{105,106}, o metanol^{107,108}, ou a separação/determinação de dois componentes, como glicerol e metanol⁶³.

A MS acoplada à FID foi utilizada com sucesso em dois trabalhos^{105,63}. Naquele em que foi realizada a determinação de glicerol livre em biodiesel por GC-MS, houve uma melhora no limite de detecção de ésteres metílicos oriundos de óleo de colza quando utilizado o modo de detecção de íons selecionados em relação à análise por apenas GC-FID¹⁰⁵. Em outro trabalho do mesmo autor⁶³, foi realizada a análise simultânea de metanol e glicerol por MS com modo de detecção de íons selecionados,

^{††} **Tricaprina** (nº CAS 621-71-6) é também conhecida como tridecanoína.

mostrando que a MS neste modo traz como vantagem a eliminação de interferências, o que possibilita a utilização de colunas menores⁶³.

A análise simultânea de vários contaminantes, realizada por Plank e Lorbeer¹⁰⁹, representou um marco importante para a GC. Neste trabalho os autores desenvolveram um método para a determinação de glicerol, MG, DG e TAG em ésteres metílicos de óleos vegetais. A trimetilsilação destes resíduos, seguidos à GC, utilizando um capilar de 10 m coberto com um filme de 0,1 µm de (5% fenil)-metilpolisiloxano permitiu a determinação de todos os analitos citados em uma corrida cromatográfica de 30 min por amostra. Os autores utilizaram os padrões internos butano-1,2,4-triol e tricaprina. Este método foi originalmente desenvolvido para um biodiesel obtido pela transesterificação de óleo de colza.

O trabalho de Plank e Lorbeer¹⁰⁹ foi de grande importância, pois influenciou no desenvolvimento das normas ASTM D6584 e EN 14105 para a determinação da qualidade do biodiesel.

Até o momento, os métodos descritos nas normas ASTM D6584 e EN 14105/14106 são indicados para a determinação da quantidade de glicerina livre, MG, DG e TAG em ésteres metílicos de AG (biodiesel metílico) utilizando a técnica de GC¹¹⁰. No Brasil, em testes realizados pela ANP⁵⁰, verificou-se que as metodologias citadas não são adequadas ao biodiesel de mamona. A antiga resolução nº 42, em seu anexo B, propôs três metodologias diferentes utilizando GC para a análise do biodiesel da mamona, sendo a primeira para a determinação de glicerol livre no biodiesel, a segunda para a determinação de MG, DG e ésteres totais, e uma terceira para a determinação de metanol e/ou etanol. Por último, foi proposto um quarto método, utilizando volumetria, para a determinação do teor de glicerina total e do teor de TAG contido no biodiesel de mamona. Na nova resolução⁵², as metodologias anteriormente descritas são omitidas, tendo em vista que já se encontram devidamente estabelecidas e publicadas pela ABNT. A Resolução nº 7 de 19 de março de 2008⁵², que substituiu a antiga resolução nº 42, cita a norma NBR 15341:2006 para a determinação de glicerol livre em biodiesel, oriundo de duas ou mais matérias-primas distintas, das quais uma consiste de óleo de mamona. A norma NBR 15344:2006 é recomendada às análises de

glicerina total e para a determinação isolada de MG, DG e TAG, além da norma NBR 15342:2006, que é específica para MG, DG e TAG.

Os autores Bondioli e Bella⁵⁸ relatam que o uso de um método alternativo algumas vezes é necessário para um controle eficiente da qualidade do biodiesel uma vez que a presença de traços de produtos voláteis em algumas amostras pode causar interferência no método de Plank¹⁰⁹.

Apesar de não ser um contaminante limitado pelas agências reguladoras, a quantificação de esteróis e ésteres de esteróis como contaminantes em biodiesel também pode ser realizada por GC¹¹¹. Estas substâncias permanecem nos óleos vegetais (matéria-prima) após processamento e posteriormente no produto final classificado como biodiesel, devido à sua solubilidade nestes ésteres. O método de detecção dos esteróis é praticamente idêntico a outros métodos de GC desenvolvidos por outros autores¹⁰², fazendo uso do reagente BSTFA (com 1% de trimetilclorosilano) e uma coluna de 0,1 µm com filme de (5% fenil)-metilpolisiloxano, diferindo apenas no uso de padrões de esteróis e modificações na programação de temperatura do sistema a fim de garantir uma melhor separação e quantificação dos picos de interesse. Neste trabalho, os autores¹¹¹ encontraram uma concentração total de esteróis nos ésteres oriundos de óleo de colza de 0,339-0,500% (m/m), enquanto que os ésteres de esteróis corresponderam a valores entre 0,558 e 0,722% (m/m). Posteriormente, o mesmo autor¹¹² fez um novo estudo e encontrou valores de esteróis entre 0,70 e 0,81%. Outros autores¹⁰¹ também pesquisaram o assunto, encontrando diferentes concentrações de esteróis e ésteres de esteróis em amostras de biodiesel.

O emprego da HPLC, apesar de não ser tão comum quanto a GC para a análise de biodiesel, oferece como vantagem, em relação à GC, um reduzido tempo de análise, uma vez que procedimentos de derivação, comuns àquela técnica, conhecidos por serem demorados e dispendiosos, geralmente não são necessários. Outra vantagem está em sua alta sensibilidade em relação à GC, fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, sua adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, sua ampla aplicabilidade a um grande número de substâncias¹¹³.

Vários detectores podem ser acoplados à HPLC, sendo a detecção UV-Vis a mais empregada. O maior inconveniente para este tipo de detector ainda está no fato de acilgliceróis e ésteres metílicos não absorverem em comprimentos de onda maiores que 220 nm. Como solução a este problema, outros detectores podem substituir a detecção UV, entre estes, o detector de índice de refração (RID), detector evaporativo de espalhamento de luz (ELSD), FID, densidade e espectrometria de massas (MS)¹¹⁴.

O primeiro método descrito na literatura para determinação total de MG, DG e TAG com HPLC, utilizou HPLC em modo isocrático com detector de densidade¹¹⁵. A separação foi conseguida pelo acoplamento de uma coluna de sílica ciano-modificada com duas colunas de cromatografia de permeação em gel (GPC). Como eluente, utilizou-se uma solução 0,6% de etanol em clorofórmio. O sistema permitiu além da detecção de MG, DG e TAG, a detecção de ésteres metílicos como uma classe de compostos, servindo também para medir o grau de conversão da reação de transesterificação.

A HPLC com ELSD foi utilizada para a quantificação de ésteres etílicos, isopropílicos, sec-butílicos e isobutílicos bem como MG, DG e TAG em biodiesel oriundo de gorduras, óleos e óleos usados em frituras. Os autores utilizaram eluição em modo gradiente (hexano e éter terc-butílico em 0,4% de ácido acético)⁹².

Em um extenso estudo, a HPLC com fase reversa (RP) foi utilizada para a determinação de contaminantes durante a produção de biodiesel (oriundo de óleo de colza), utilizando vários métodos de detecção: a detecção no UV em 205 nm, ELSD e MS com ionização química a pressão atmosférica (APCI-MS) no modo de íon positivo¹¹⁴. Neste trabalho, foi mostrado que a confiança e linearidade de cada método de detecção variam de acordo com os vários tipos de TAG presentes. A utilização de ELSD e APCI-MS ocasionou um decréscimo na sensibilidade com o aumento do número de ligações duplas nos ésteres metílicos de AG, enquanto que a UV, não permitiu a quantificação de AG saturados. Todavia, a sensibilidade da detecção UV é diferente para os TAG analisados individualmente. A conclusão obtida foi que a detecção com APCI-MS seria o método de detecção mais apropriado para a análise de

biodiesel proveniente do óleo de colza. Posteriormente, o método utilizando HPLC em APCI-MS foi revisado acerca de sua aplicabilidade para a análise de biodiesel¹¹⁶.

Komers e colaboradores¹¹⁷ desenvolveram também um método para a determinação de MG, DG e TAG usando HPLC com detecção UV na região de 205 nm. O trabalho envolve a reação de metanólise do óleo de colza. Os autores utilizaram uma coluna de vidro de 150x3 mm com uma pré-coluna de 30x3 mm, ambas empacotadas com C18 com partículas de diâmetro 7 µm utilizando fase móvel de A (acetonitrila:água 80:20), B (acetonitrila) e C (hexano:propan-2-ol 40:50). O método descrito permitiu o estudo cinético e mecanístico das complexas reações envolvidas durante a transesterificação, mostrando possibilidade de controlar a composição complexa da mistura da reação em cada momento da produção a fim de obter ou controlar os produtos da reação com uma qualidade adequada aos padrões europeus.

Em outro trabalho empregando HPLC-RP e detecção UV-Vis, foi possível a determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos, AG livres, MG, DG e TAG em biodiesel. O método permitiu a determinação de todos os contaminantes em uma única corrida com um tempo inferior a 30 min¹¹⁸.

Entre as técnicas hifenadas, a LC-GC mostrou-se bastante promissora, uma vez que pode reduzir a complexidade dos cromatogramas de fase gasosa, permitindo uma identificação mais precisa dos picos. Lechner e colaboradores¹¹⁹, realizaram a separação de MG, DG e TAG de ésteres metílicos de AG após acetilação dos grupos hidroxílicos e posterior eluição em uma coluna de cromatografia líquida (fase móvel hexano:cloro de metileno:acetonitrila na razão 79,97:10:0,05) utilizando um detector UV-Vis de comprimento de onda variável. A análise por GC com detector FID foi realizada em uma capilar de 10 m com (5% fenil)-metilpolisiloxano em um tempo de 52 min para cada corrida cromatográfica¹¹⁹.

A técnica LC-GC mostra-se interessante também para a análise de esteróis em biodiesel oriundo de óleo de colza^{112,120}. Plank e Lorbeer¹²⁰ realizaram este estudo em ésteres metílicos de cinco diferentes matérias-primas (óleo de colza, soja, girassol, girassol rico em ácido oléico e óleos usados em frituras). O sistema utilizado consistia de LC em linha com GC. Antes da análise, os ésteres foram siliados com N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA). A separação dos ésteres metílicos dos

esteróis foi conseguida mediante o emprego da LC com um sistema de solventes formados por hexano:cloro de metileno:acetonitrila (79,9:29:0,1) e a GC se deu em uma coluna de 12 m de (5% fenil)-metilpolisiloxano com FID. O método utilizado pelo autor (LC-GC) foi comparado com o método que consiste na saponificação e isolamento da fração de esteróis e detecção por apenas GC. Os autores concluíram que o método hifenado desenvolvido é mais rápido e apresentou uma boa reprodutibilidade além de fornecer mais informações sobre a amostra.

A cromatografia de alta performance por exclusão de tamanho (HPSEC ou SEC), é uma técnica que pode ser utilizada para o monitoramento e análise dos produtos de transesterificação. Esta técnica é similar à HPLC em instrumentação, porém, o princípio da técnica consiste na separação dos analitos com base nos diferentes tempos de retenção, que são função das massas molares das substâncias. Os autores Trathnigg e Mittelbach¹¹⁵ foram os primeiros a utilizar a GPC acoplada a HPLC, conforme mencionado anteriormente. Logo em seguida, Fillières e colaboradores¹²¹ empregaram esta técnica para a quantificação de ésteres etílicos, TAG, DG, MG e glicerol oriundos de óleo de colza e, alguns anos depois, Darnoko e colaboradores¹²² realizaram um aperfeiçoamento deste método para a análise simultânea de TAG, DG e MG, bem como ésteres metílicos e glicerol utilizando duas colunas PHENOGELTM em série com um detector de índice de refração, e tetraidrofurano (THF) como fase móvel. As amostras foram preparadas por diluição e neutralização. Os autores relatam que as colunas foram calibradas com soluções padronizadas dos compostos, oferecendo ao método, uma boa reprodutibilidade para os produtos de transesterificação do óleo de palma com um desvio padrão de 0,27 a 3,87% a diferentes taxas de conversão.

Em outro trabalho envolvendo GPC, Dubé e colaboradores¹²³ sugeriram dois métodos distintos para o monitoramento da produção de biodiesel metílico a partir de óleo de canola previamente usado em frituras, sendo GPC acoplada a um detector de índice de refração (GPC-RID) e reflexão total atenuada (ATR) acoplada à espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O decréscimo do pico em 1378 cm^{-1} (devido ao grupo metil terminal e aos OCH_2 nos acilgliceróis) nos espectros de ATR-FTIR foi utilizado para monitorar a síntese de biodiesel. A

comparação entre os dois métodos em 100 amostras de biodiesel mostrou diferenças menores que $\pm 2\%$. Como desvantagens aos dois métodos, a GPC-RID permitiu a quantificação de apenas MG e ésteres metílicos, enquanto que a ATR-FTIR a soma de todos os acilgliceróis.

Em trabalho posterior, Arzamendi e colaboradores¹²⁴ utilizaram a GPC-RID para a determinação de MG, DG, TAG, glicerol livre, metanol e ésteres metílicos de AG oriundos de óleo de girassol. Os autores utilizaram duas colunas Styragel® HR0.5 e HR2 além de detectores de viscosidade em paralelo. Como fase móvel empregou-se THF. Os autores relatam que apenas um pico cromatográfico é obtido para cada analito, o que resulta em uma quantificação fácil e exata das substâncias. De acordo com os autores, o método é simples, rápido, robusto e pode ser realizado em temperatura ambiente sem que isso afete na exatidão e reprodutibilidade do método.

O acoplamento da cromatografia líquida com detectores RID (HPLC-RID) foi utilizado por Hájek e colaboradores¹²⁵ para a determinação de glicerol livre em biodiesel. O método ofereceu um limite de detecção de 60 mg kg^{-1} e resultados concordantes com aqueles obtidos pela GC. Como inconveniente, o método consome um tempo de 3 h, incluindo a preparação das amostras.

Na literatura, o primeiro método de detecção eletroanalítico para a determinação de glicerol livre em biodiesel (oriundo de óleo de colza) utilizou um detector de pulso amperométrico (PAD) em HPLC (HPLC-PAD)¹²⁶. Este trabalho também é considerado o primeiro a quantificar glicerol livre em biodiesel por meio da HPLC. O método mostrou-se rápido, simples e preciso. A maior vantagem apontada pelo autor está em sua detectabilidade, apresentando um limite de detecção de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ (1 mg kg^{-1}), bem abaixo dos máximos delimitados pelas agências reguladoras, que está em $200 \mu\text{g g}^{-1}$. O método oferece uma sensibilidade comparada à dos métodos enzimáticos, considerados os mais sensíveis. Como desvantagens, o autor ilustra uma faixa de trabalho relativamente restrita de 0 a $50 \mu\text{g g}^{-1}$, o que leva a crer que análises de amostras com concentrações de glicerol livre acima desta faixa de trabalho necessitam de diluições. Outro inconveniente está no método de extração apresentado, com um tempo superior a 2 h.

Finalmente, a determinação de metanol em biodiesel por microextração em fase sólida no modo *headspace* foi realizada por Paraschivescu e colaboradores¹²⁷. Os autores utilizaram uma fibra de carboxeno-polidimetilsiloxano e uma subsequente análise por GC-FID empregando colunas HP-5. O método mostrou uma boa reprodutibilidade e recuperação, permitindo a análise do metanol em concentrações bem abaixo das estabelecidas pelas normas.

1.2.2 Métodos espectroscópicos

Dentre os métodos espectroscópicos utilizados para análise e monitoramento da reação de transesterificação, há trabalhos que se utilizam da ressonância magnética nuclear (NMR) de ^1H e de ^{13}C , da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-RAMAN).

Os métodos baseados na NMR podem revelar informações importantes acerca do mecanismo e cinética da reação de transesterificação envolvida. Todavia, as vantagens apontadas pelos autores para esta técnica não podem ocultar os altos custos de instrumentação e manutenção. Por meio da NMR, pode-se avaliar o grau de conversão em ésteres de AG durante uma reação de transesterificação, podendo ser utilizada em alguns casos para a determinação de acilgliceróis em biodiesel.

Gelbard e colaboradores¹²⁸ descreveram o primeiro método para a determinação do rendimento de uma reação de transesterificação baseado em ^1H NMR. Os autores utilizaram os prótons do grupo metilênico adjacentes à porção éster do TAG ($\alpha\text{-CH}_2$, 2,3 ppm, t) e os prótons do grupo metóxido do éster (OCH_3 , 3,7 ppm, s). Segundo os autores, o método desenvolvido é mais rápido e mais simples que aqueles utilizados com a cromatografia.

A determinação da reversibilidade e cinética da reação de transesterificação metílica de óleo de colza mostrou-se possível no trabalho de Dimmig e colaboradores¹²⁹ em ^{13}C NMR. Os sinais obtidos perto de 14,5 ppm dos grupos metílicos terminais, os quais não são afetados pela reação, foram utilizados

como padrão interno para a análise quantitativa. Os carbonos dos acilgliceróis foram registrados entre 62 e 71 ppm e, o carbono pertencente a grupo metílico, em aproximadamente 51 ppm. A partir destes resultados foi possível esclarecer a cinética da reação de transesterificação envolvida, mostrando que a formação de DG e MG respondem pela etapa mais lenta e, conseqüentemente, a etapa determinante da velocidade de reação.

A quantificação de ésteres etílicos de AG em biodiesel (oriundos de óleo de soja) também foi analisada por $^1\text{H NMR}$ ¹³⁰ mostrando-se, segundo os autores, mais rápida e simples que os métodos que utilizam da GC e HPLC. Seguindo a mesma técnica, Morgenstern e colaboradores¹³¹ determinaram o grau de insaturação em óleo de soja e em ésteres metílicos de AG oriundos de óleo de soja.

Uma alternativa atraente para o monitoramento da reação de transesterificação de óleos ou gorduras é a espectroscopia NIR. Os primeiros trabalhos utilizando desta técnica foram realizados por Knothe^{132,65}. O método desenvolvido baseia-se na diferença entre os espectros NIR nas regiões de 6005 e entre 4425 e 4430 cm^{-1} , onde os ésteres metílicos apresentam picos, enquanto que TAG apresentam ombros. De forma análoga, os ésteres etílicos também podem ser distinguidos, conforme relata o autor.

A NIR associada a análises pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS) e pelo método da regressão do componente principal (PCR) também se mostrou eficiente para a determinação do conteúdo de água e metanol em biodiesel, conforme trabalho de Felizardo e colaboradores^{133,134}. Os autores deixam claro que o uso de um método de pré-processamento, tal como a correção de sinal ortogonal (COS), torna-se essencial para o desenvolvimento do PLS e modelos PCR.

Em outro trabalho, usando a PLS-NIR, Baptista e colaboradores¹³⁵ determinaram a quantidade de ésteres de AG em biodiesel bem como a presença de ésteres metílicos do ácido linolênico (C18:3) em amostras de biodiesel em escala industrial e de laboratório.

A técnica FTIR foi utilizada por Zagonel e colaboradores¹³⁶ em uma abordagem multivariada, usando um algoritmo PLS que usa o pico do éster entre 1700 e 1800 cm^{-1} para monitorar a etanolise do óleo de soja degomado. Os autores

consideraram o método rápido e exato para determinar o rendimento da reação. A FTIR com o mesmo algoritmo, porém na região entre 1300 e 1060 cm^{-1} , foi utilizada por Siatis e colaboradores¹³⁷ para a determinação simultânea de ésteres metílicos de AG e TAG. Em outro trabalho visando a análise do rendimento da reação de transesterificação, também empregando a FTIR, Barone¹³⁸ concluiu que a área dos picos dos grupos metílicos, bem como suas posições, podem ser utilizadas para o monitoramento da reação.

A espectroscopia FT-RAMAN foi utilizada por Ghesti e colaboradores¹³⁹ para monitorar e quantificar a reação de transesterificação do óleo de soja. Os autores utilizaram um método uni- e multivariado para construir uma curva analítica de verificação do método. Utilizando uma normalização interna padrão, o melhor resultado foi alcançado pelo modelo de calibração RAMAN-PLS. Posteriormente, os mesmos autores correlacionaram este método com um novo método desenvolvido baseado na NMR¹⁴⁰ para o monitoramento da etanolise do óleo de soja, concluindo que este método pode ser estendido para a transesterificação de óleos vegetais.

1.2.3 Métodos espectrofotométricos

Muitos métodos desenvolvidos para a determinação de contaminantes orgânicos em biodiesel utilizam da GC e HPLC. Alguns contaminantes como o glicerol ou metanol, podem ser facilmente separados por uma extração do tipo líquido-líquido, viabilizando o desenvolvimento de métodos mais simples, rápidos e baratos. Neste sentido, a espectrofotometria é uma técnica conhecida por atender estes quesitos.

O primeiro trabalho encontrado na literatura para a determinação de glicerina total e glicerina livre em biodiesel fez uso de um método enzimático seguido de análise por espectrofotometria⁵⁴. O procedimento envolve uma reação de saponificação à temperatura de 130 °C, seguida de resfriamento e extração em fase sólida para posterior análise enzimática. Este método foi desenvolvido para biodiesel oriundo de óleo de colza, não conseguindo distinguir MG, DG e TAG. Apesar do baixo custo e ser inicialmente projetado para ser simples, este método foi considerado relativamente

complexo com um longo tempo de análise e baixa reprodutibilidade por alguns autores^{106,126}. Alguns anos depois, a empresa Sigma-Aldrich desenvolveu um *Kit* (BQP-02) para determinação enzimática da glicerina total e livre em biodiesel. O método é baseado na reação enzimática com a glicerina livre e total, com posterior análise fotométrica dos produtos coloridos.

Os autores Bondioli e Bella⁵⁸ também desenvolveram um método espectrofotométrico para a determinação de glicerol livre presente em ésteres metílicos de AG. Para a separação do glicerol contido no biodiesel, foi utilizada uma extração do tipo líquido-líquido (água:B100) em uma única etapa com posterior análise da fase aquosa. O método desenvolvido é baseado na oxidação do glicerol a formaldeído, utilizando-se de metaperiodato de sódio, seguido da reação de Hantzsch com acetilacetona, a uma temperatura de 70 °C por 1 min sob agitação manual, a qual permite a formação do composto 3,5-diacetil-1,4-diidrolutidina. Após a reação de Hantzsch, os autores verificaram a necessidade de resfriar as amostras a uma temperatura de 20-25 °C para, só depois, suas absorvâncias serem lidas no espectrofotômetro a 410 nm. As recuperações obtidas oscilaram entre 89 e 100% para as 5 amostras analisadas.

Visando investigar a eficiência do método de Bondioli e Bella⁵⁸, Louzeiro e colaboradores¹⁴¹ realizaram um tratamento estatístico daquele método, analisando parâmetros como precisão, limite de detecção e quantificação, além da linearidade. Os autores obtiveram uma curva analítica pela adição de alíquotas de um padrão de glicerol diretamente na amostra de biodiesel tipo B100, seguindo toda a etapa de extração líquido-líquido, aquecimento a 70 °C e resfriamento a 25 °C para finalmente realizarem as medidas. A curva analítica obtida apresentou $r = 0,9948$. Segundo os autores, o método se mostrou pouco preciso, porém, suficientemente sensível para determinar o teor de glicerina livre com um limite de detecção de 4 mg L⁻¹. A extração utilizada envolveu a pesagem de 1 g de biodiesel tipo B100 com 4 mL de hexano e 4,00 mL de solução extratora 1:1 (água:etanol). A faixa de linearidade exibe valores de concentração entre 50 e 200 mg L⁻¹ para absorvâncias entre 0,2 e 0,8.

A determinação do metanol residual em biodiesel também pode ser realizada por meio da espectrofotometria-UV. Os autores Fang e Zeng¹⁴² obtiveram

uma curva analítica de 0 a 103,6 µg/25 mL com $r = 0,997$. As recuperações obtidas estiveram entre 95,2 e 97,4% com um coeficiente de variação menor que 0,395%. O método, segundo os autores, mostrou-se razoável e com boa reprodutibilidade.

Finalmente, um método espectrofotométrico na região do visível foi desenvolvido por Araujo e colaboradores¹⁴³ para determinar a quantidade de metanol em biodiesel. Os autores realizaram uma análise em fluxo através de uma membrana de microporos hidrofílica, que teve por finalidade extrair o metanol do biodiesel. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm, após derivação com álcool oxidase, peroxidase solúvel e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico (ABTS). O método mostrou duas faixas de trabalho, sendo a primeira até 0,015 e a segunda até 0,200% (m/m), com um limite de detecção estimado de 0,0002 e 0,007% (m/m), respectivamente. Os resultados obtidos por este método mostraram-se bastante precisos, com um desvio padrão menor que 5% ($n = 10$) e uma capacidade de detecção de 0,211% (m/m). Os resultados obtidos foram comparados com os da GC e se mostraram concordantes. O método desenvolvido mostra vantagens em relação à GC, tendo em vista o baixo custo e por ser ecologicamente correto.

1.2.4 Outros métodos

A viscosimetria pode ser utilizada como uma ferramenta para o monitoramento ou indicação do término da reação de transesterificação. Os autores de Filippis e colaboradores¹⁴⁴ foram os primeiros a desenvolver um método utilizando-se desta técnica para a análise de biodiesel. O método desenvolvido se baseia na grande diferença de densidades entre os óleos (TAG) e os ésteres de AG, que chega a ser de uma ordem de grandeza. Foram analisadas amostras de biodiesel oriundas de diferentes matérias-primas e seus resultados foram concordantes com aqueles obtidos pela GC. O método mostrou-se simples, rápido e barato. Como condição, a viscosidade do produto final, que depende da composição em AG, deve ser aparentemente conhecida.

O desenvolvimento de outro método, utilizando um viscosímetro de onda acústica de estado sólido (ViSmartTM)¹⁴⁵, foi capaz de detectar o ponto final da reação em escala piloto e pode ser utilizado futuramente para monitorar o processo de produção de biodiesel. A principal vantagem deste método está na utilização de um instrumento que não necessita do acompanhamento da densidade.

Os autores Gonçalves Filho e Micke¹⁴⁶ desenvolveram um método para a determinação de glicerol livre em biodiesel baseado na eletroforese capilar com detecção UV-Vis com detector de arranjo de diodos (DAD). Antes da análise, realiza-se a reação entre glicerol e periodato e, em menos de 2 min, o iodato é produzido. Os autores analisaram biodiesel comercial oriundo de gordura de frango, óleo de soja e óleo de rícino. Foi obtido um valor de $r > 0,9991$ com um limite de detecção de $4,3 \text{ mg L}^{-1}$. Em um estudo de recuperação realizado pelos autores, foram obtidos valores entre 95,4 e 102,4%. Os autores concluíram que o método é simples, rápido e confiável.

O regulamento técnico nº 1 contido na Resolução nº 7 de 19 de março de 2008⁵² especifica um teor máximo de água de 500 mg kg^{-1} , indicando para sua determinação, os métodos ASTM D6304 e EN ISO 12937. Por indicação das normas, a determinação de água deve ser realizada pela titulação Karl-Fischer, cujo procedimento pode ser visto em um artigo de Faas e Schlink¹⁴⁷.

Além dos trabalhos já citados^{133,134} para a determinação de água em biodiesel, Todd e colaboradores¹⁴⁸ descreveram a utilização da espectrometria de massa por introdução via membrana (MIMS) para a determinação de água em biodiesel. Segundo os autores, o método mostra possibilidades de ser utilizado para monitorar o processo de síntese de biodiesel.

Em um trabalho de Catharino e colaboradores¹⁴⁹, foi desenvolvido um método baseado na espectrometria de massa por ionização através de eletronebulização (ESI). O método possibilita a obtenção de um perfil espectral dos ésteres monoalquílicos derivados de diversas fontes graxas, marcadores quimitaxonômicos de degradação e o tipo do álcool (etílico ou metílico) utilizado no processo de produção, além de fornecer um *screening* rápido e capaz de indicar qualitativamente a presença de glicerol, MG, DG e TAG no biodiesel. A técnica desenvolvida mostra-se interessante no sentido de tornar possível identificar a origem e a qualidade do biodiesel.

1.3 Glicerol

O glicerol ou propano-1,2,3-triol (IUPAC, 1993)¹⁵⁰ é um líquido higroscópico à temperatura ambiente, límpido como água, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. Seu nome origina-se da palavra grega *glykis*, que significa doce. Ele foi isolado pela primeira vez em 1779, pelo químico sueco Carl Whilhelm Scheele por meio do aquecimento de PbO (chamado de litargírio, do grego *lithárgyros*) misturado ao óleo de oliva com posterior extração utilizando água.

O glicerol está presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal, porém, combinado a estes na forma de MG, DG ou TAG.

O termo glicerol aplica-se somente à substância pura propano-1,2,3-triol e o termo glicerina ao produto em sua forma comercial purificada, normalmente contendo um teor maior ou igual a 95% de glicerol¹⁵¹. Vários graus de glicerina estão disponíveis comercialmente, diferindo no teor de glicerol, cor, odor e traços de impurezas. Ele é miscível em água e álcool, solúvel em éter etílico, acetato de etila e dioxano, e insolúvel em benzeno, tetracloreto de carbono, clorofórmio e hidrocarbonetos de cadeia longa¹⁵². Algumas propriedades físicas do glicerol estão ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Algumas propriedades do glicerol

Propriedade	Valor
Ponto de fusão (°C)	18,17
Densidade a 20 °C (g cm ⁻³)	1,2613
Ponto de ebulição (1 atm = 101,325 kPa) (°C)	290
em 13,33 kPa	222,4
em 1,33 kPa	166,1
em 0,53 kPa	14,9
no vácuo	1,2617
100% glicerol no ar	1,260
95% glicerol no ar	1,2491
Pressão de vapor (Pa)	
a 50 °C	0,33
a 100 °C	26
a 150 °C	573
a 200 °C	6100
Tensão superficial a 20 °C (m N ⁻¹)	1499
Calor de vaporização (J mol ⁻¹)	
a 55 °C	88,12
a 195 °C	76,02
Calor de dissolução em diluição infinita (kJ mol ⁻¹)	5,778
Calor de formação (kJ mol ⁻¹)	667,8
Condutividade térmica (W)	
a 25 °C	0,285 W m ⁻¹ K ⁻¹
a 50 °C	0,288 W m ⁻¹ K ⁻¹
a 75 °C	0,292 W m ⁻¹ K ⁻¹
a 100 °C	0,296 W m ⁻¹ K ⁻¹
Ponto de fulgor (°C)	
<i>closed cup</i>	160
<i>cleveland open cup</i>	177
<i>Pensky-Martens closed cup</i>	199
Ponto de ignição	204

Todo glicerol obtido até 1949 provinha de glicerídeos presentes em gorduras e óleos, sendo que entre 1960 e 1970, houve um pico na produção de glicerol

por via sintética a partir do propileno. Em 2000, a produção mundial de glicerol foi de 800 mil toneladas, sendo que 10% disto foram oriundos de indústrias responsáveis pela produção de biodiesel¹⁵³.

O glicerol proveniente dos glicerídeos vem de três processos, sendo o primeiro e principal deles, da fabricação do sabão, posteriormente da produção de AG e da produção de ésteres de AG.

Na indústria de fabricação de sabão, a gordura ou óleo é fervido na presença de soda cáustica e sal. Desta reação, tem-se como subproduto a glicerina, que é isolada graças à presença do sal, que promove a separação desta mistura em duas fases, onde a fase menos densa contém o sabão e, a mais densa, glicerol, água, sal e excesso de soda cáustica da reação.

A produção de AG se dá por processos contínuos de saponificação, marcados, assim como na saponificação, pela existência de uma fase mais densa, a qual é extraída o glicerol. Este processo consiste na hidrólise do glicerídeo, que ocorre sob alta pressão (5 MPa), obedecendo um fluxo de subida na coluna tendo como contracorrente vapor de água a temperaturas de 250 a 260 °C. O glicerídeo é assim quebrado pela água em glicerol e AG. A remoção dos AG resultantes deste processo é feita no topo da coluna enquanto que a fase contendo glicerol (fase denominada de água doce) desloca-se para o fundo, onde é removida. Os AG provenientes desta “quebra” são utilizados na fabricação de sabão ou comercializados em sua forma bruta após purificação e refino.

A terceira origem do glicerol se dá pela esterificação dos óleos e gorduras com um álcool (geralmente metanol ou etanol) para produzir ésteres de AG, reação conhecida como transesterificação. O glicerídeo, neste caso, reage com um catalisador alcalino (podendo ser ácido) para produzir o éster metílico ou etílico e é removido pela lavagem com água. Os ésteres provenientes podem ser vendidos como ésteres de gordura ou utilizados como aditivos para combustíveis, tais como o diesel.

No processo de fabricação do sabão, a parte densa é conhecida pelo nome de *spent lye* na língua inglesa, contendo de 8 a 15% de glicerol; a “água doce”, proveniente da hidrólise do glicerídeo com a água, contém algo em torno de 20% de glicerol e, finalmente, o produto mais denso, proveniente da reação de

transesterificação, contém 80% ou mais de glicerol. Sabe-se ainda que a qualidade do glicerídeo (óleo ou gordura) utilizado na reação afeta de forma considerável a produção de um glicerol de qualidade aceitável ao mercado.

Para todos estes processos a remoção de contaminantes é necessária, sendo que, para a remoção de contaminantes do processo conhecido como *spent lye* e água doce, tem-se a adição de ácido clorídrico e soda cáustica. O inconveniente da adição de ácidos ou bases está na formação de possíveis sais solúveis que podem trazer algumas dificuldades na posterior purificação da glicerina.

Após extração do glicerol, vários processos são utilizados para purificar e remover o excesso de sais presentes (sabão) ou soda cáustica para que o produto tenha uma qualidade aceitável.

De todos os processos já discutidos, o glicerol cru obtido pela transesterificação mostra-se como o de melhor qualidade, porém, alguns contaminantes, tais como sais residuais da reação, estarão presentes em concentrações da ordem de 1% ou mais.

A qualidade com que é obtido o glicerol cru determina qual será a operação de refino e posterior rendimento da glicerina. As especificações para o glicerol cru geralmente limitam o teor de cinzas, isto é, a quantidade de sal e resíduo mineral; matéria orgânica que não é glicerol, na qual inclui AG e ésteres; trimetileno glicol (propano-1,3-diol), água, arsênico e açúcares¹⁵⁴.

Para se refinar o glicerol de origem natural (animal/vegetal), a destilação ainda é o meio mais utilizado, seguido pelo tratamento com carvão ativo ou por meio de colunas de troca iônica.

Após destilação, a fração crua conhecida como *spent lye*, apresenta uma composição de 80% de glicerol, 7% de água, 2% de resíduos orgânicos e menos de 10% de cinzas. Já a porção obtida pela hidrólise do glicerol cru tem geralmente uma qualidade superior de glicerol, com um teor de glicerol de 88%, um conteúdo de cinzas menor que 1% e menos que 1,5% de resíduos orgânicos.

A destilação do glicerol em atmosfera padrão (pressão normal) não é viável devido à polimerização que ocorre em alguma temperatura logo abaixo de 204 °C. Para solucionar este problema, as indústrias realizam um misto de vácuo e

destilação a vapor. Sendo assim, é costume empregar uma temperatura entre 165 e 180 °C a uma pressão de 10-20 mbar. Os vapores passam através de uma série de condensadores ou por uma seção de fracionamento na parte superior do destilador, onde o glicerol é logo em seguida condensado.

Vários produtos utilizam a glicerina em sua produção, tais como tabaco, alimentos comuns, resinas alquídicas, poliéster, celofane, explosivos e até medicamentos. Devido a esta grande demanda de glicerol, há a necessidade de remoção de qualquer cor ou odor que ele possa apresentar. Técnicas como a utilização de carvão ativo (1-2%) e filtros auxiliares de diatomito são muito empregadas. No processo, o diatomito é frequentemente adicionado ao tanque de descoloração a uma temperatura entre 74 e 79 °C com agitação de 1 a 2 h e então, filtra-se à mesma temperatura. Esta temperatura é alta o suficiente para permitir uma boa filtração e não é alta a ponto de permitir o escurecimento do glicerol.

Nos Estados Unidos, a maior parte do glicerol é refinada pelos métodos descritos acima, todavia, várias refinarias empregam ou tem empregado o sistema de troca iônica.

Há dois graus de glicerina crua que são comercializados: glicerol obtido do sabão (*soap-lye*), por meio da concentração da parte mais densa oriundo do processo contínuo de elaboração do sabão, que contém cerca de 80% de glicerol e, glicerol cru hidrolisado, resultante da hidrólise de gorduras contendo ca. 88-91% de glicerol combinado e uma pequena quantidade de sais orgânicos.

Como o glicerol proveniente de ésteres metílicos e etílicos contém sal, ele normalmente é comercializado como *soap-lye* cru.

Desde 1959, o glicerol é reconhecido como seguro para propósitos gerais, tais como ser adicionado a alimentos. O nível oral LD₅₀ de glicerol em ratos¹⁵⁵ é de 470 mg kg⁻¹ e em porquinhos da índia¹⁵⁶ de 7750 mg kg⁻¹. Alguns estudos¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ mostram que o glicerol pode ser administrado em animais e seres humanos sem qualquer efeito adverso, podendo, inclusive, ser administrado por via intravenosa (solução contendo 5% de glicerol)¹⁶⁰.

O glicerol é utilizado em quase toda indústria, desde fármacos até produtos de higiene pessoal, como creme dental e líquido para limpeza bucal. Quando

presente em alimentos é facilmente digerido e metabolizado juntamente com os carboidratos. Em flavorizantes e corantes, o glicerol age como solvente e sua viscosidade confere consistência ao produto. Uvas saturadas com glicerol permanecem macias quando misturadas a cereais. Este pode ser utilizado como solvente, agente umectante ou como ingrediente em xaropes e elixires. Em doces e sorvetes, o glicerol retarda a cristalização do açúcar. Para um rápido resfriamento de alimentos, o glicerol pode ser utilizado também como meio facilitador da transferência de calor, por estar em contato direto com o alimento.

Na área médica o glicerol está presente na composição de pomadas, medicamentos para tosse e anestésicos, tais como soluções de glicerol-fenol, para tratamento de ouvidos e em meio de cultura bacteriológica. Substâncias derivadas do glicerol são utilizadas como tranquilizantes e em medicamentos para controle da pressão, como a nitroglicerina que é um poderoso vasodilatador. Em cosméticos, mostra-se presente em muitos cremes e loções que mantêm a maciez e umidade da pele. Em cremes dentais, é comum ser utilizado para conferir-lhe brilho, suavidade e viscosidade.

Na produção de tabaco, o glicerol é pulverizado sobre suas folhas a uma quantidade de 2% em peso antes das mesmas serem rasgadas e empacotadas, isto permite que as folhas não fiquem ressecadas e impede, juntamente com outros agentes flavorizantes, que suas folhas se tornem quebradiças e se reduzam a pó. A adição do glicerol também afeta na velocidade da queima e no aroma do produto.

Na indústria têxtil, também é utilizado para amaciar e aumentar a flexibilidade das fibras. Na indústria de papel e celulose o glicerol ainda pode ser utilizado em papéis especiais, que necessitam de alguns agentes plastificantes, para conferir-lhes maleabilidade e tenacidade.

Como lubrificante é apenas utilizado quando o óleo mineral apresenta alguma incompatibilidade. Como exemplo, podemos citar sua utilização em compressores de oxigênio, pois se sabe que o glicerol apresenta uma maior resistência à oxidação em relação a outros óleos minerais. É comum seu uso em bombas e rolamentos expostos à gasolina e ao benzeno. Na indústria alimentícia, farmacêutica e

de cosméticos, é utilizado quando há o contato dos produtos com o lubrificante empregado.

A utilização do glicerol como um lubrificante se deve ao fato deste possuir uma alta viscosidade e conhecida habilidade em se manter como um fluido a baixas temperaturas sem apresentar modificações em suas propriedades. Para aumentar seu poder lubrificante, pode-se adicionar grafita em pó ao glicerol e, quando há necessidade de diminuição de viscosidade, pode-se adicionar água e/ou álcool.

Economicamente o glicerol pode ser considerado como um indicador da atividade industrial de um país, pois há inúmeros processos industriais que o utilizam. Seu consumo em períodos de prosperidade tende a aumentar e em épocas de recessão tende a diminuir.

2 OBJETIVOS

Considerando a importância em desenvolver novos métodos analíticos, rápidos, sensíveis e baratos para a determinação da qualidade do biodiesel, considerando ainda a carência de métodos eletroanalíticos para esta finalidade, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia eletroanalítica capaz de quantificar glicerol, por meio de sua oxidação em eletrodos de platina bem como desenvolver um método de extração que torne possível a aplicação do método proposto em amostras de biodiesel tipo B100.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos e reagentes

Utilizou-se glicerol (99,5% de pureza) e acetona (PA), ambos de marca Synth. Como eletrólito de suporte foi utilizada uma solução de ácido perclórico preparada a partir do HClO_4 70% de marca Merck. Todas as soluções necessárias foram preparadas com água deionizada Milli-Q (Millipore, USA). Em testes preliminares de extração, utilizou-se o hexano PA (mistura de isômeros) de marca Hexis Científica. O biodiesel de soja analisado foi obtido do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato modelo PGSTAT30 da AUTOLAB[®] do Brasil. Empregou-se uma célula eletroquímica de 25 mL em um sistema de três eletrodos: discos de platina com área de $7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ e $0,125 \text{ cm}^2$ como eletrodos de trabalho, um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$ como eletrodo de referência.

Todas as pesagens foram efetuadas em uma balança analítica de marca Sartorius modelo BL 210S.

As amostras foram homogeneizadas em um agitador de tubos de ensaio modelo 251 e levadas a uma centrífuga EXCELSA BABY I modelo 206, ambos da FANEM.

As extrações em fase sólida foram realizadas em cartuchos AccuBond II ODS-C18 de 500 mg/6 mL da Agilent Technologies.

Para a aquisição de dados do AUTOLAB, utilizou-se um computador Pentium III Dell GX-110 com o programa GPES versão 4.9. De posse destes resultados, utilizou-se o Software Microcal Origin[™] versão 7.5 para a confecção dos voltamogramas e curvas analíticas.

3.2 Procedimentos eletroanalíticos

Previamente às medidas eletroquímicas o eletrodo de trabalho foi polido com alumina com tamanho de partícula de $0,3 \mu\text{m}$, posteriormente lavado rigorosamente com água deionizada. Após limpo, o procedimento de ativação do eletrodo de platina consiste na realização de 50 ciclos sucessivos voltamétricos entre os potenciais de -140 e $+1300$ mV *versus* $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ em solução de ácido perclórico 100 mmol L^{-1} a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Nos estudos de variação de acidez, as ativações em ácido foram realizadas da mesma forma, porém, nas mesmas concentrações de ácido das determinações. Os valores de corrente de pico utilizados para as determinações quantitativas foram aqueles entre os potenciais de 400 e 800 mV *versus* $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$.

Para a determinação dos valores de corrente de pico, utilizou-se como linha de base a reta obtida pela extrapolação da porção linear do voltamograma que antecede o pico, seja na varredura anódica ou catódica.

Os valores de concentração nas quantificações foram obtidos a partir da interpolação do sinal da corrente de pico na equação da curva analítica obtida pela aplicação dos mínimos quadrados.

Para a construção da curva analítica, utilizou-se 12 amostras com concentrações de glicerol entre $1,80$ e 150 mg L^{-1} ($1,95 \times 10^{-2}$ e $1,63 \text{ mmol L}^{-1}$) a partir de uma solução de glicerol padrão ($10,01 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$) previamente preparada. As medidas foram registradas em triplicata para cada valor de concentração.

3.3 Procedimentos de extração

Em tubos de ensaio com tampa rosqueada pesou-se 2 g de biodiesel tipo B100 e adicionou-se 6,00 mL de água. Os tubos foram levados ao agitador de tubos de ensaio por 5 min e, em seguida, centrifugados por 10 min. A fase aquosa contendo glicerol e outras impurezas foi separada e eluída em um cartucho do tipo C18, previamente condicionado com 6 mL de acetona e 24 mL de água. A eluição da fase aquosa no cartucho de C18 tem por finalidade adsorver na fase sólida vestígios de substâncias/sais orgânicos que interferem no método eletroquímico desenvolvido. A seguir, um volume preciso de 4,00 mL da amostra eluída foi levado à rotoevaporação, a uma pressão de 200 mmHg (ca. 26,7 kPa) e temperatura de 80 °C por 7 min, tempo necessário para que o volume se reduzisse a pouco menos de 1 mL. A rotoevaporação tem por finalidade eliminar traços de metanol, naturalmente presentes no solvente acetona, que interferem nas medidas eletroquímicas. Em seguida, transferiu-se quantitativamente a amostra pré-concentrada a um balão volumétrico de 5,00 mL a uma concentração de 100 mmol L⁻¹ de ácido perclórico com o ajuste do menisco. O procedimento de extração descrito pode ser empregado para uma massa de até 4 g de biodiesel tipo B100, se necessário.

3.4 Preparação de amostras de controle

3.4.1 Amostra de biodiesel isenta de glicerol

Para obter uma amostra de biodiesel isenta de glicerol, aproximadamente 50 mL de biodiesel foram transferidos para um funil de separação e lavados a quente com porções de água deionizada até que a fase aquosa se apresentasse transparente. Posteriormente, alíquotas da fase orgânica com traços de água foram drenadas e centrifugadas até uma separação satisfatória de fases. A fase orgânica foi então drenada e levada a um frasco de destilação a 105 °C por 3 h, a fim de garantir a eliminação da água residual. Análises das amostras tratadas pelo método desenvolvido confirmaram a ausência de glicerol livre.

3.4.2 Amostra de biodiesel com concentração conhecida de glicerol

Transferiu-se uma amostra de 10 g de biodiesel (pesada com precisão de 0,1 mg) isento de glicerol (conforme descrito em 3.4.1) para um tubo de ensaio com tampa rosqueada e adicionou-se 160 µL de uma solução padrão $10,01 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol. A seguir, a amostra foi agitada em um agitador de tubos de ensaio até homogeneização e levada a um frasco de destilação a 105 °C por 3 h para garantir que toda água residual fosse eliminada. O biodiesel preparado seguindo este procedimento apresenta uma concentração de glicerol de 160 mg kg^{-1} .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comportamento voltamétrico do glicerol

Vários compostos aromáticos são detectados por meio de sua oxidação em eletrodos inertes, tais como Au, Pt e carbono vítreo¹⁶¹. O efeito da aromaticidade no mecanismo da reação é de estabilizar os produtos radicais livres das etapas de oxidação com transferência de um elétron por deslocalização (dos elétrons desemparelhados) na nuvem π . De forma contrária, apesar de termodinamicamente favorável¹⁶², esta oxidação e estabilização não ocorre tão rapidamente em compostos alifáticos, como em alcoóis e aminas.

Sabe-se que a estabilização de radicais livres intermediários pode ocorrer em metais nobres que possuem orbitais *d* insaturados. O benefício eletrocatalítico da estabilização destes radicais intermediários livres é, muitas vezes, acompanhado da formação de uma “sujeira” na superfície do eletrodo¹⁶³. Este fenômeno deve-se à adsorção e acumulação dos produtos oxidados na superfície do eletrodo na forma de um filme. A adsorção de espécies eletroinativas pode inibir (ou envenenar) a reação eletródica pela formação de uma camada impenetrável que bloqueia a superfície do eletrodo ou, em alguns casos, pode acelerar a reação eletródica, devido a efeitos de dupla camada elétrica ou efeitos devido à adsorção ânion-induzida de íons metálicos¹⁶⁴.

A fim de manter a superfície do eletrodo limpa, alguns autores utilizaram a HPLC-PAD na detecção de alcoóis alifáticos^{126,165-167}. A técnica consiste na detecção amperométrica com uma polarização catódica e anódica aplicada de forma alternada. Em se tratando de eletrodos de carbono vítreo, apesar desta técnica também ser utilizada com frequência, esta se mostra ineficaz para a detecção de alcoóis alifáticos, provavelmente devido à incapacidade do carbono de estabilizar os radicais livres intermediários¹⁶⁶.

De uma forma geral, a HPLC-PAD une a versatilidade e alta eficiência das técnicas de separação com a sensibilidade e seletividade das técnicas eletroquímicas. Todavia, as vantagens desta técnica não podem ocultar os altos custos de instrumentação e manutenção envolvidos, que muitas vezes são justificados apenas

pelo tempo de análise relativamente rápido ou pelos baixos limites de detecção alcançados.

Neste sentido, técnicas mais simples muitas vezes mostram-se mais atraentes para a quantificação de determinados analitos, principalmente quando os limites máximos tolerados de concentração dos analitos de interesse, em uma dada matriz, são relativamente elevados, o que exclui a necessidade de técnicas tão sofisticadas e dispendiosas.

Em uma investigação na literatura, pôde-se verificar que o comportamento de alcoóis em eletrodos de platina e ouro já é conhecido há algum tempo, bem como os problemas relativos à sua eletro-oxidação¹⁶⁸. Sabe-se ainda que, em todos os potenciais aplicados, as moléculas adsorvidas de alcoóis são oxidadas, sendo que os produtos formados durante a oxidação dependem principalmente do potencial aplicado e do pH do eletrólito. Em potenciais próximos à conhecida região de oxigênio, a oxidação dissociativa do glicerol leva à formação do ácido fórmico, ácido oxálico e glicólico e, quando o potencial é fixado a valores próximos de 0,75 V *versus* eletrodo reversível de hidrogênio (RHE), há a formação do gliceraldeído¹⁶⁹.

Em meio ácido somente os eletrodos de platina são eletroativos, todavia, em meio alcalino, ambos os eletrodos, platina e ouro, particularmente ouro, produzem grande densidade de corrente^{170,171}.

A atividade eletrocatalítica da platina é incrementada consideravelmente com o emprego de eletrodos formados por uma liga de Pt-Au, atingindo sua maior eletroatividade quando há 35% de ouro¹⁷². O mecanismo proposto envolve hidroxilas adsorvidas, que são presumíveis de participarem na etapa de transferência de oxigênio^{170,173}.

Um estudo utilizando voltametria cíclica e espectroscopia FTIR *in situ*, com o objetivo de investigar a adsorção e oxidação do glicerol em eletrodos de platina, demonstrou que a oxidação do glicerol neste eletrodo envolve um complexo processo de superfície, incluindo desidrogenação, adsorção e estágios de dissociação¹⁷⁴.

O comportamento eletroquímico do eletrodo de platina imerso em ácido perclórico 100 mmol L⁻¹ em velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, na ausência de

qualquer espécie eletroativa, está ilustrado na Figura 5. A varredura foi realizada entre os potenciais de -140 e 1300 mV *versus* Ag/AgCl_(sat) e registrado o 50º ciclo.

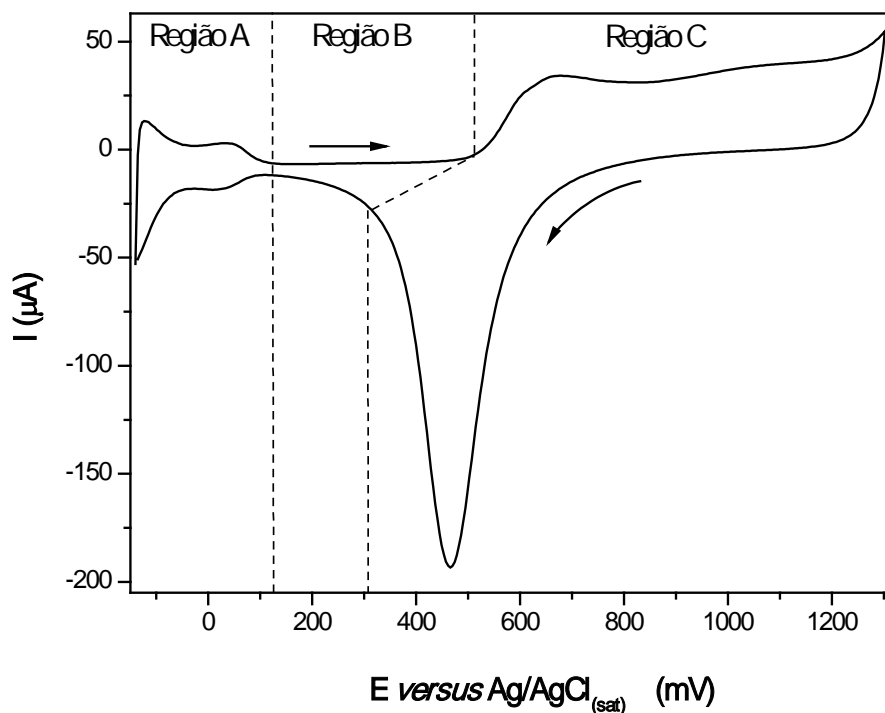


Figura 5 – Voltamograma cíclico em eletrodo de platina ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 50$).

Na Região A, que ocorre em potenciais abaixo de 120 mV *versus* Ag/AgCl_(sat), está indicada a região do hidrogênio, nome dado em virtude dos processos que antecedem o desprendimento do gás H₂. Nesta região, na varredura catódica (parte inferior do voltamograma), há a adsorção do hidrogênio atômico formado a partir da redução de H⁺ e, na varredura anódica (parte superior do voltamograma), ocorre a oxidação do hidrogênio atômico previamente adsorvido. O processo é conhecido por ser reversível, pois as quantidades de cargas envolvidas na varredura catódica e anódica são idênticas¹⁷⁵. A reação catódica está ilustrada na Equação 1:



Os picos observados na Região A devem-se às orientações cristalográficas da platina expostas ao meio reacional.

Na Região B, de 120 a 510 mV *versus* Ag/AgCl_(sat), há a presença de processos não faradáicos em que o eletrodo é idealmente polarizável. Esta região é conhecida como região da dupla camada. Continuando com a varredura anódica, na Região C, entre 510 e 1300 mV *versus* Ag/AgCl_(sat), observa-se a oxidação superficial do eletrodo de platina (sistema Pt/O₂). Este processo está relacionado com a adsorção de OH⁻ proveniente da oxidação da água. Na varredura catódica, o pico observado em 465 mV *versus* Ag/AgCl_(sat) corresponde à redução dos óxidos formados na varredura anódica¹⁷⁵.

Diferentemente do que ocorre na região de hidrogênio, os potenciais de oxirredução na Região C não são coincidentes, evidenciando um processo irreversível.

A partir do voltamograma da Figura 5, sabe-se que qualquer espécie eletroativa nos potenciais correspondentes à região de hidrogênio será afetada em seu mecanismo de oxirredução pela presença do hidrogênio atômico adsorvido, que é uma espécie muito reativa. Na região da dupla camada, a tendência será a presença de uma superfície catalítica onde há apenas platina metálica, sem, portanto, a presença de espécies superficiais, como óxidos, exceto aquelas relacionadas à estrutura da dupla camada. Na Região C, os processos eletroquímicos envolvidos serão afetados pela presença de óxidos na superfície da platina afetando também na definição do mecanismo e cinética do processo eletrocatalítico¹⁷⁵.

Na Figura 6, está ilustrado o comportamento voltamétrico da platina na presença e ausência de glicerol em solução de ácido perclórico.

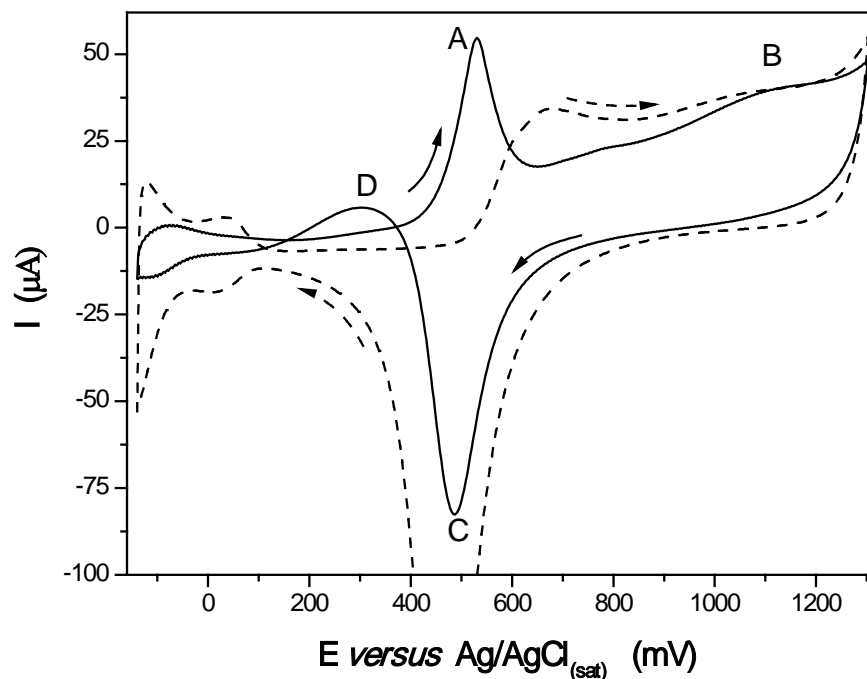


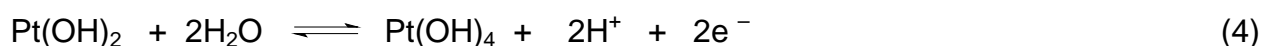
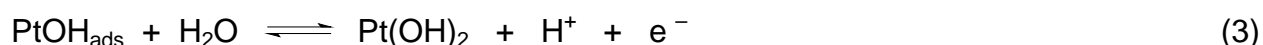
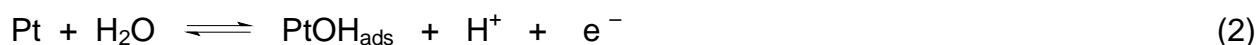
Figura 6 – Voltamograma cíclico em platina na ausência (- - -) e presença (—) de glicerol ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 1,54 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo}_{(\text{glicerol})} = 20$).

Na presença de glicerol, na concentração e faixa de potenciais analisados, observa-se em potenciais menores que 120 mV *versus* Ag/AgCl_(sat) uma inibição dos picos de adsorção/dessorção (varredura catódica/anódica) de hidrogênio devido à quimissorção do glicerol na superfície do eletrodo de platina.

Para a varredura anódica, também na presença de glicerol, observa-se um pico entre 400 e 600 mV *versus* Ag/AgCl_(sat) referente à oxidação direta do glicerol na superfície do eletrodo. A seguir, há um pico B de baixa intensidade de corrente entre 1000 e 1300 mV *versus* Ag/AgCl_(sat) devido à dessorção anódica do glicerol/intermediários simultaneamente com a formação de óxidos na superfície do eletrodo de platina. Na varredura catódica não são observados picos entre 1300 e 700 mV *versus* Ag/AgCl_(sat), indicando, neste intervalo de potencial, a ausência de atividade na superfície de óxidos formada anteriormente. Para o intervalo entre 600 e

400 mV *versus* Ag/AgCl_(sat), observa-se a redução catódica da camada de óxidos (C) seguida de uma nova oxidação entre 400 e 200 mV *versus* Ag/AgCl_(sat) (D).

Alguns trabalhos explicam o comportamento de óxidos na superfície do eletrodo de platina em meios de ácido sulfúrico e perclórico¹⁷⁶⁻¹⁸⁰. Os autores Burke e O'Dwyer¹⁷⁷, concluíram que, em meio de ácido perclórico, o crescimento dos óxidos hídricos formados na superfície de platina pela técnica de varredura sucessiva de potencial envolve um processo mecanístico complexo que, por sua vez, é de difícil explicação, sugerindo, pelos picos apresentados durante as reduções de óxidos, a presença de óxidos de platina(IV) hidratados. Os autores Hu e Liu¹⁷⁹, em um trabalho semelhante, porém, com a utilização de ácido sulfúrico como eletrólito e metanol como espécie orgânica presente, sugerem os seguintes óxidos ao longo das multicamadas de óxidos formadas, conforme descritos pelas Equações 2 a 4.



Os estados de oxidação de platina em (2), (3) e (4) podem estar presentes simultaneamente na camada de óxidos formada. Possivelmente este também é o perfil dos óxidos formados na presença de glicerol em meio de ácido perclórico com a realização dos ciclos sucessivos voltamétricos.

De acordo com Roquet e colaboradores¹⁶⁹, que conduziram um estudo cinético e mecanístico da oxidação eletrocatalítica do glicerol usando uma concentração de glicerol de 0,1 mol L⁻¹, a quase sobreposição das curvas de potencial (Figura 6, picos A e D), na presença de glicerol, durante as varreduras de potencial positivas e negativas, sugerem um efeito de envenenamento. Porém, o fato das curvas não serem perfeitamente sobrepostas é presumível devido à velocidade limitante de adsorção do glicerol na superfície de platina, recentemente reduzida, durante a velocidade de varredura relativamente rápida para potenciais negativos.

Em se tratando da oxidação do metanol em ácido sulfúrico, os autores Hu e Liu¹⁷⁹ atribuíram os picos quase coincidentes à coexistência das espécies Pt⁰ e

PtOH_{ads} na superfície do eletrodo, sendo que, em potenciais mais positivos, há um máximo na formação da monocamada de óxidos e, na varredura catódica, a reoxidação do metanol se inicia após a redução parcial da monocamada de óxidos.

Picos de oxidação na varredura catódica de potencial também foram observados em etanol e outros alcoóis alifáticos na literatura, tanto para eletrodos de platina como em ouro¹⁶⁶.

Nesta etapa do trabalho, os estudos da variação da velocidade de varredura de potencial e concentração serão realizados para os dois picos de oxidação, chamados de A e D, localizados entre 200 e 800 mV *versus* Ag/AgCl_(sat).

4.2 Estudo da influência da velocidade de varredura

O comportamento voltamétrico da solução de glicerol $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de ácido perclórico 100 mmol L^{-1} na superfície do eletrodo de platina em diferentes velocidades de varredura está ilustrado na Figura 7.

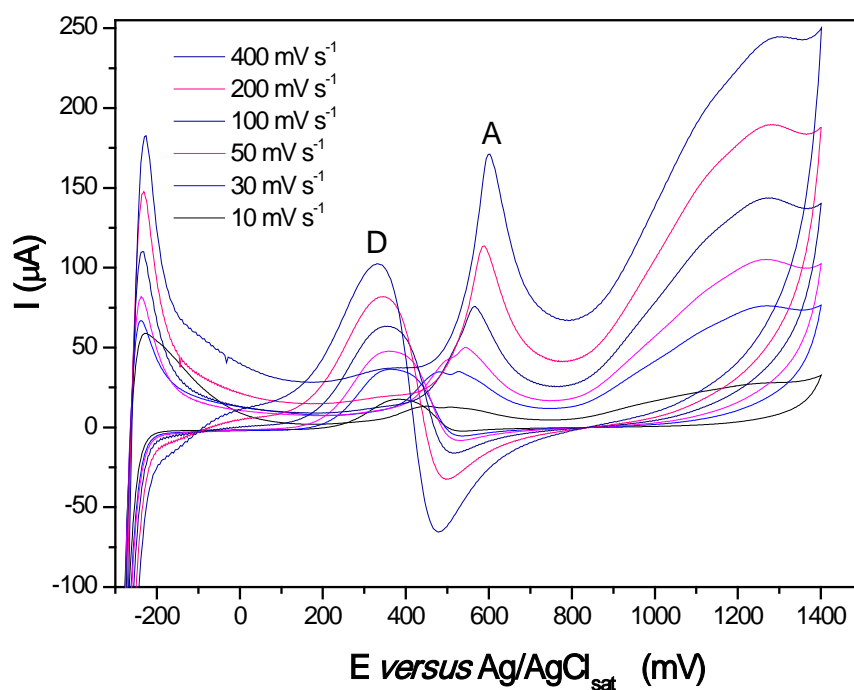


Figura 7 – Voltamogramas para estudos de velocidade de varredura ($a = 7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 400 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 2$).

Na Tabela 2 estão listados os principais parâmetros eletroquímicos a diferentes velocidades de varredura para a oxidação do glicerol nos dois picos de oxidação entre 200 e 800 mV *versus* $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

Tabela 2 – Influência da velocidade de varredura de potencial nos principais parâmetros voltamétricos da oxidação do glicerol em HClO_4 100 mmol L^{-1}

Pico A (500 – 750 mV)				Pico D (450 – 200 mV)			
v (mV s⁻¹)	E_p (mV)	I_p (μA)	 E_p-E_{p1/2} (mV)	v (mV s⁻¹)	E_p (mV)	I_p (μA)	 E_p-E_{p1/2} (mV)
10	447	10±2	0,067	10	384	19±2	0,081
20	464	19±1	0,059	20	370	31±1	0,093
30	480	25,1±0,4	0,059	30	364	40,7±0,4	0,097
40	537	31,1±0,3	0,094	40	363	47,6±0,3	0,094
50	544	36,7±0,2	0,085	50	362	54,0±0,2	0,091
75	557	46,8±0,2	0,065	75	358	66,0±0,2	0,088
100	566	56±1	0,056	100	355	73,5±0,2	0,085
150	575	71±2	0,045	150	348	86±1	0,082
200	588	84±2	0,044	200	345	98±3	0,078
300	592	110±5	0,038	300	338	115±3	0,073
400	600	123±5	0,041	400	332	130±4	0,070

Deslocamentos anódicos que ocorrem com a variação da velocidade de varredura de potencial podem ser consequência de processos totalmente irreversíveis ou reversíveis acoplados a reações químicas irreversíveis¹⁸¹. Para ambos os picos analisados, há um deslocamento do potencial com o aumento da velocidade de varredura. Os valores de $|E_p - E_{p1/2}|$, para ambos os picos, variam também com o aumento da velocidade de varredura de potencial. Nos processos reversíveis é esperado um valor constante para o potencial de pico. Sendo assim, os dados sugerem que não se trata de um processo reversível.

As Figuras 8 e 9 ilustram o efeito da corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) e velocidade de varredura (v) para os picos de oxidação A e D registrados na Figura 7.

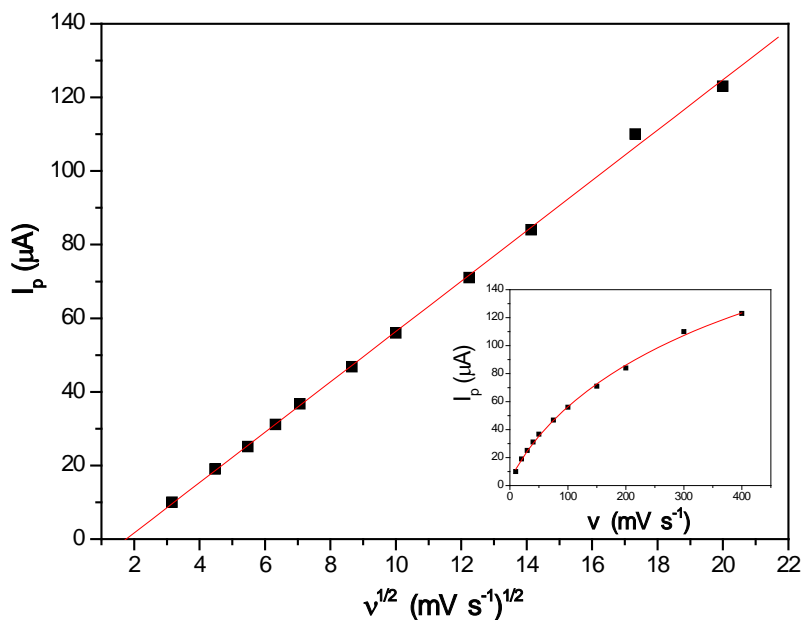


Figura 8 – Efeito da variação da corrente de pico A em função de v e $v^{1/2}$ ($a = 7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 400 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 2$).

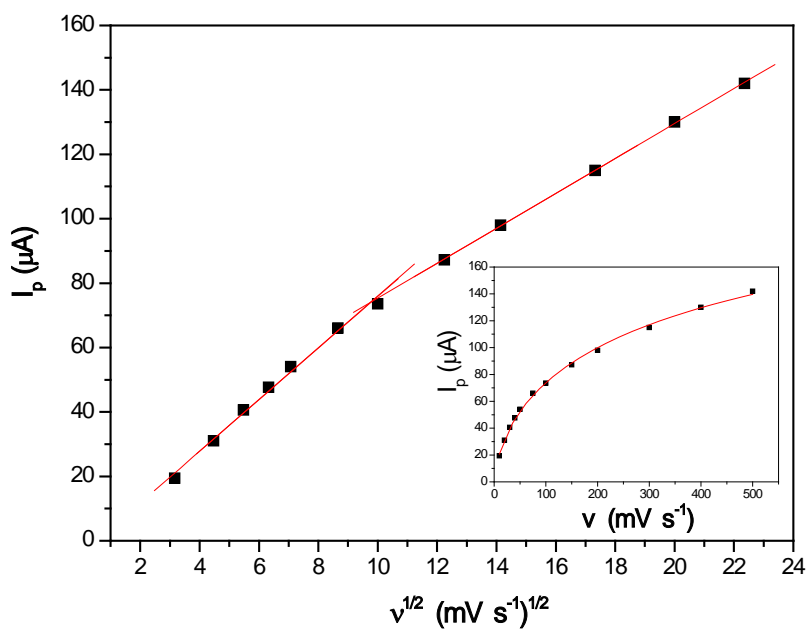


Figura 9 – Efeito da variação da corrente de pico D em função de v e $v^{1/2}$ ($a = 7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 400 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 2$).

Os resultados obtidos para o pico A sugerem um controle difusional para o transporte de massa, tendo em vista a linearidade de I_p versus $v^{1/2}$.

Para o pico D, observa-se um comportamento linear para velocidades de varredura menores e maiores que 100 mV s^{-1} , o que sugere um processo difusional para o transporte de massa para velocidades menores que 100 mV s^{-1} .

Os mesmos estudos foram realizados para um eletrodo com maior área geométrica ($a = 0,125 \text{ cm}^2$), o que permitiu um aumento significativo nas intensidades de corrente de pico obtidas, possibilitando a quantificação de soluções de glicerol de menor concentração, como pode ser visto na Figura 10, para uma solução de glicerol com concentração de $5,00 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de ácido perclórico 100 mmol L^{-1} .

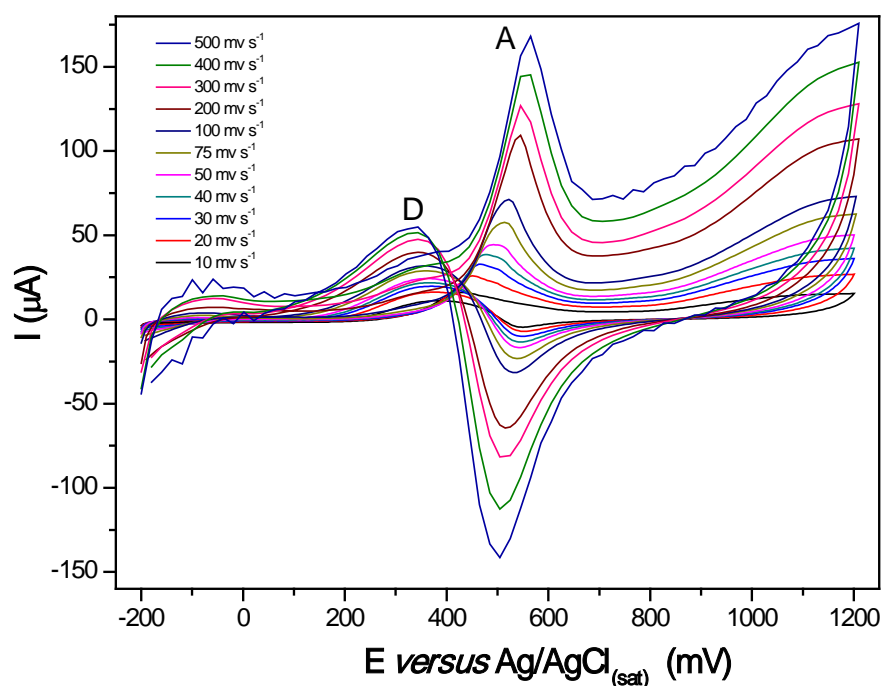


Figura 10 – Voltamogramas para estudos de velocidade de varredura ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 500 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).

Nas Figuras 11 e 12 estão ilustrados I_p versus $v^{1/2}$ para os picos A e D expostos na Figura 10. Nas condições estudadas, os resultados foram semelhantes aos

já obtidos em concentrações maiores para o outro eletrodo de trabalho de menor área geométrica. Sendo assim, a utilização de um eletrodo de maior área permitiu que a mesma intensidade de corrente, anteriormente obtida, fosse atingida, porém, a uma concentração de glicerol bem menor (10 vezes menor). A linearidade obtida sugere igualmente que o tipo de transporte de massa, sob as condições analíticas empregadas, se manteve como difusional.

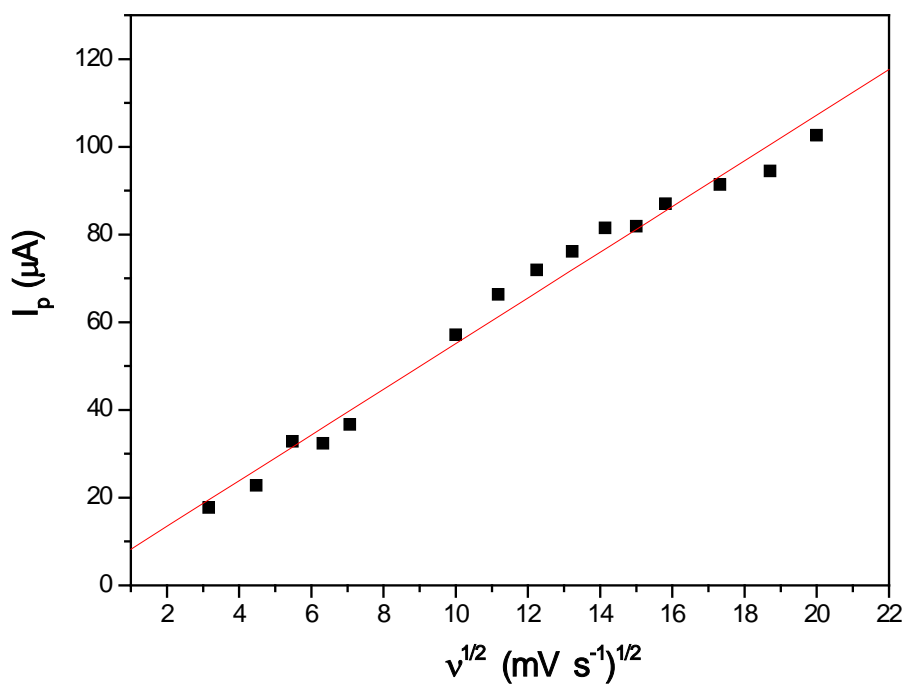


Figura 11 – Efeito da variação da corrente de pico A em função de $v^{1/2}$ ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 500 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).

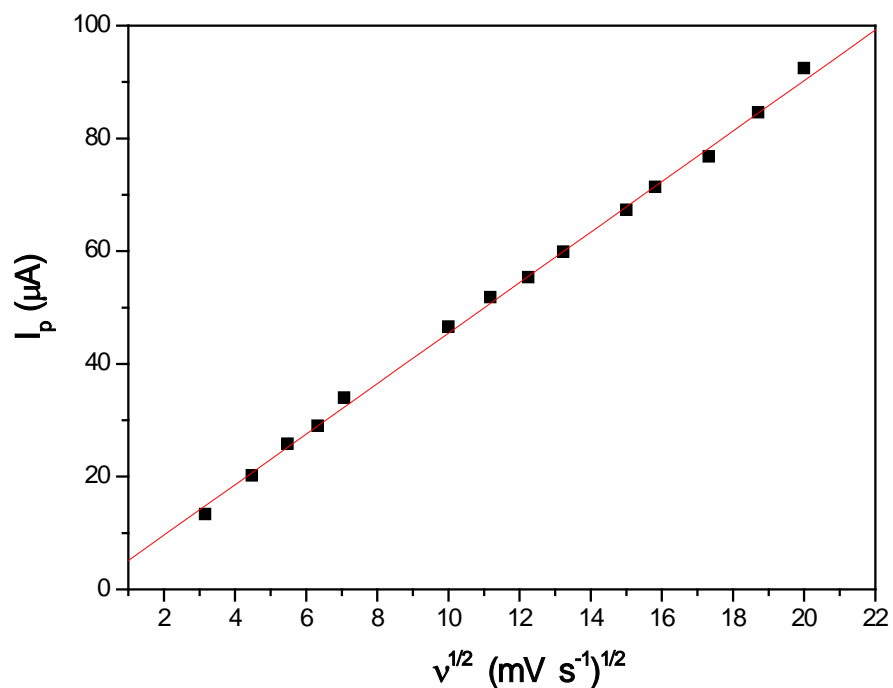


Figura 12 – Efeito da variação da corrente de pico D em função de $v^{1/2}$ ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 500 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).

Lacourse e colaboradores¹⁶⁶ empregaram a concentração de ácido perclórico de $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em suas medidas por pulso amperométrico a fim de não danificar a coluna cromatográfica utilizada. Para fins de verificação, o comportamento voltamétrico da solução de glicerol $5,00 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de ácido perclórico $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ sobre eletrodo de platina em diferentes velocidades de varredura está ilustrado na Figura 13.

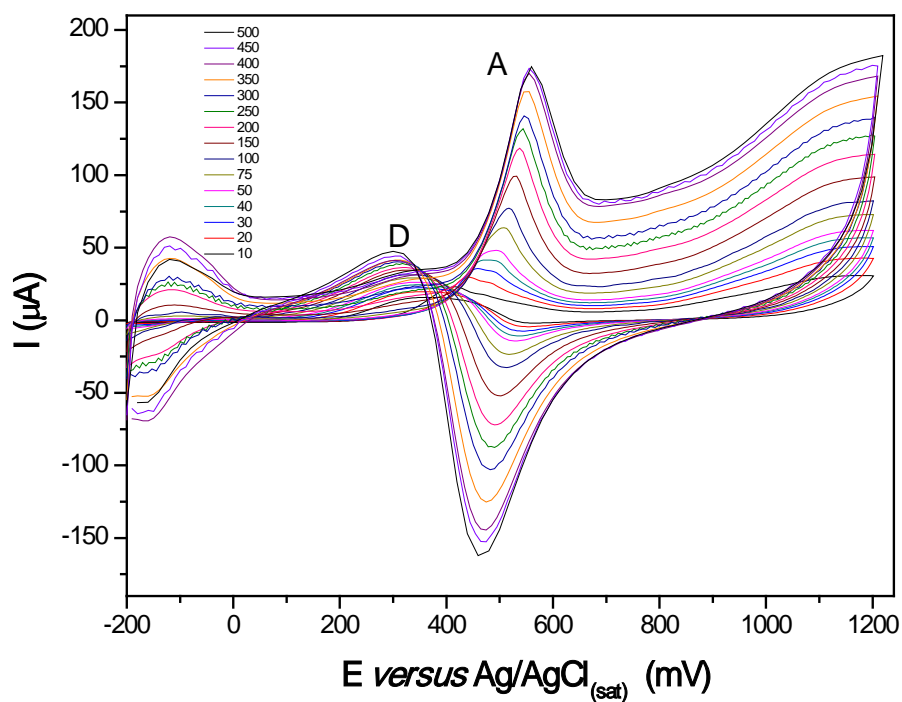


Figura 13 – Voltamogramas para estudos de velocidade de varredura ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 500 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).

Os gráficos de I_p versus $v^{1/2}$ foram feitos para os picos A e D expostos na Figura 13, como pode ser visualizado nas Figuras 14 e 15.

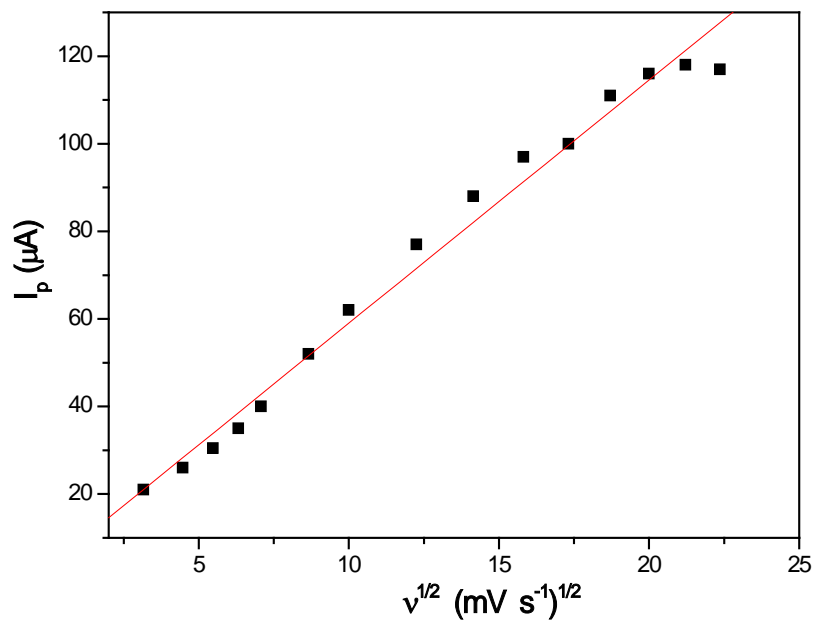


Figura 14 – Efeito da variação da corrente de pico A em função de $v^{1/2}$ ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 500 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).

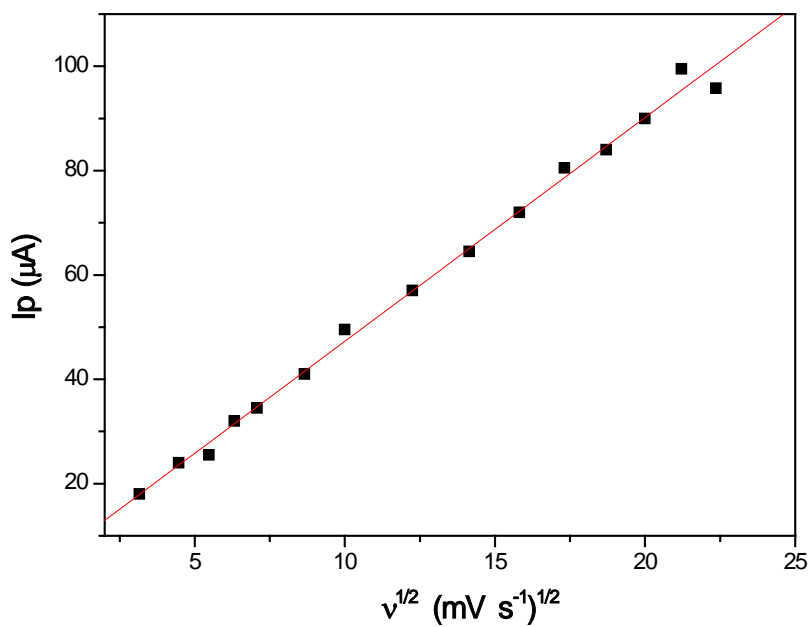


Figura 15 – Efeito da variação da corrente de pico D em função de $v^{1/2}$ ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 10,0 - 500 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).

Ficou demonstrado que o tipo de transporte de massa não foi afetado pela concentração de eletrólito do meio e nem pela concentração de glicerol para o pico A. Arbitariamente optou-se por utilizar a velocidade de varredura de potencial de 100 mV s^{-1} para as medidas eletroquímicas seguintes. Esta escolha levou em consideração a já conhecida alta relação entre corrente faradaica/capacitiva para esta velocidade de varredura potencial.

A próxima etapa será verificar a linearidade da curva analítica para o eletrodo de trabalho em concentrações de ácido perclórico de $50,0$ e 100 mmol L^{-1} .

4.3 Estudo da variação da concentração de glicerol

O efeito da variação da concentração de glicerol foi investigado entre $5,00$ e $70,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para o eletrodo de área $7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ conforme ilustrado na Figura 16.

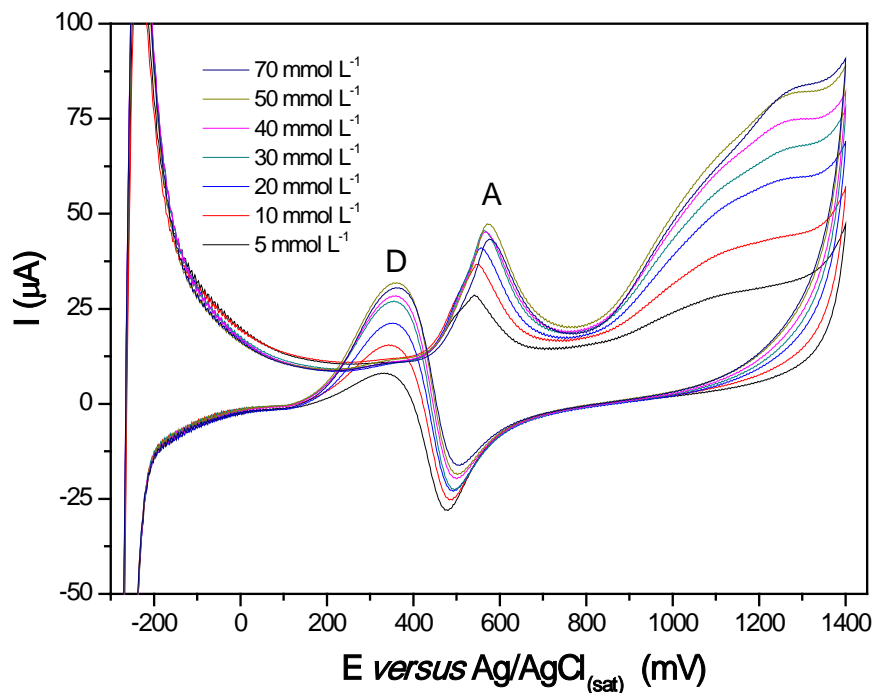


Figura 16 – Voltamogramas do efeito da concentração de glicerol ($a = 7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 - 70,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 3$).

Na Tabela 3 está demonstrado o efeito da concentração do glicerol nos valores de corrente e potencial dos picos de oxidação A e D ilustrados na Figura 16.

Tabela 3 – Influência da concentração de glicerol nos parâmetros voltamétricos em HClO_4 100 mmol L^{-1}

Pico A (400 – 700 mV)			Pico D (450 – 200 mV)		
C (mmol L^{-1})	E_p (mV)	I_p (μA)	C (mmol L^{-1})	E_p (mV)	I_p (μA)
5,00	542	17 \pm 1	5,00	332	15 \pm 1
10,0	549	23 \pm 1	10,0	345	23 \pm 1
20,0	558	27 \pm 1	20,0	353	30 \pm 1
30,0	566	31 \pm 1	30,0	356	33 \pm 1
40,0	570	31 \pm 1	40,0	360	37 \pm 1
50,0	574	32 \pm 1	50,0	363	38 \pm 1
70,0	576	31 \pm 1	70,0	364	38 \pm 1

Para o grande intervalo de concentração estudado, foi possível observar um comportamento de constância de sinal para ambos os picos, caracterizados pelo surgimento de um patamar de corrente para concentrações maiores que 30 mmol L^{-1} , conforme observado nas Figuras 17 e 18.

O patamar observado é típico dos sistemas em que há bloqueio da superfície do eletrodo pelos óxidos ou produtos formados, no caso, pela oxidação do glicerol.

Apesar deste patamar de sinal de corrente se tornar mais evidente em concentrações próximas de 30 mmol L^{-1} de glicerol, o desvio de linearidade em função da concentração ocorreu em concentrações bem menores que esta.

Sabendo-se que eletrodos de menor área produzem intensidades menores de corrente, optou-se por prosseguir as investigações analítica apenas no eletrodo de área 0,125 cm^2 .

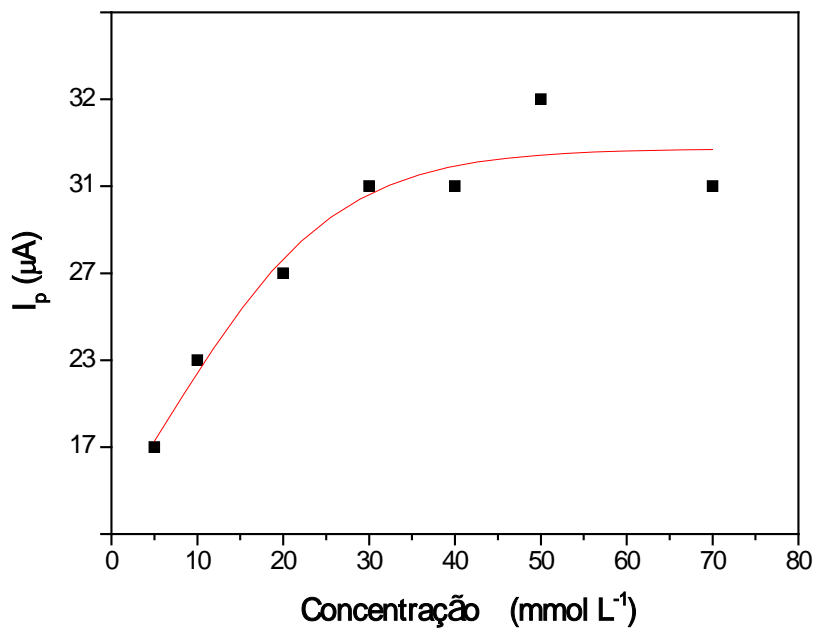


Figura 17 – Efeito da corrente de pico anódica A com a concentração de glicerol ($a = 7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 - 70,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 3$).

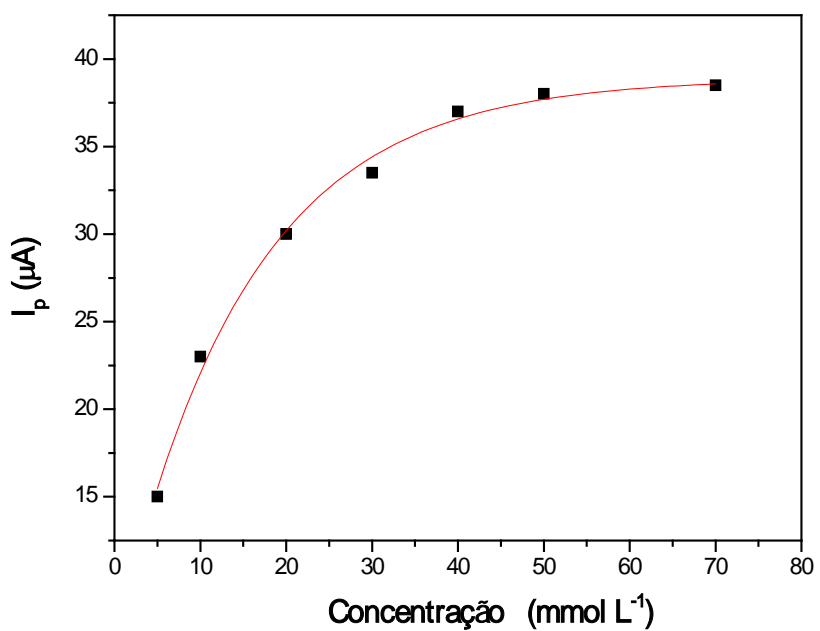


Figura 18 – Efeito da corrente de pico anódica D com a concentração de glicerol ($a = 7,1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 5,00 - 70,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 3$).

O mesmo estudo foi realizado em um intervalo de concentração entre 0,500 e 5,00 mmol L⁻¹ de glicerol em solução de ácido perclórico de 100 e 50,0 mmol L⁻¹, para uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

As curvas analíticas para os picos A e D estão ilustradas nas Figuras 19 e 20, respectivamente. Uma resposta linear foi obtida para ambas as curvas analíticas, com equação de reta para o pico A: $I_p(\mu\text{A}) = 17,54 + 10,35 C(\text{mmol L}^{-1})$ com $r = 0,99496$ para os 6 primeiros pontos. Para o pico D: $I_p(\mu\text{A}) = 10,61 + 7,10 C(\text{mmol L}^{-1})$ com $r = 0,9982$ para os 8 primeiros pontos

É possível observar que, para o pico A, uma concentração de glicerol acima de 3,0 mmol L⁻¹ já apresentou desvio de linearidade. Fato semelhante ocorreu para o pico D, em concentrações acima de 4,0 mmol L⁻¹.

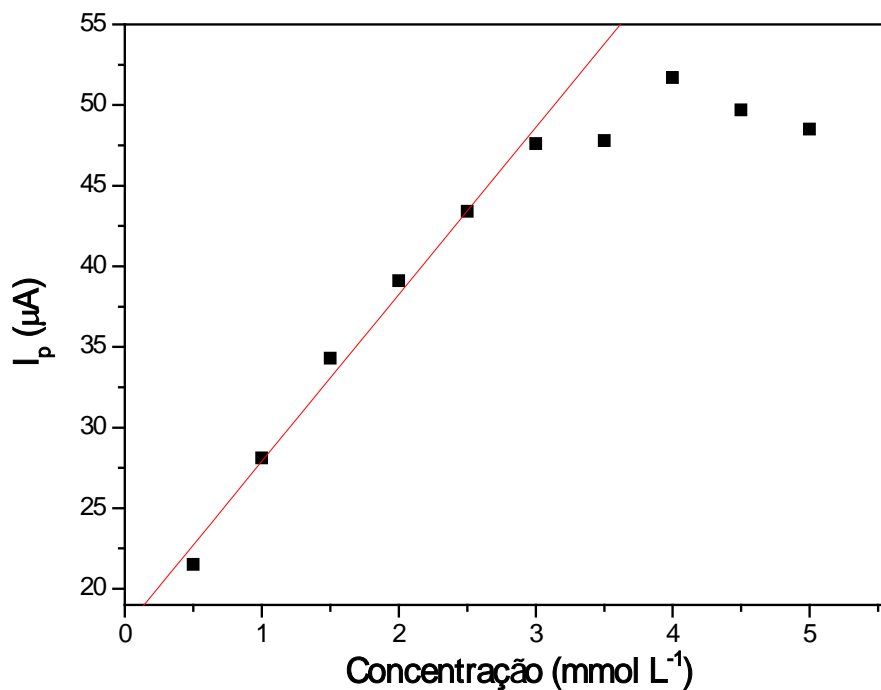


Figura 19 – Efeito da corrente de pico anódica A com a concentração de glicerol ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 0,500 - 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).

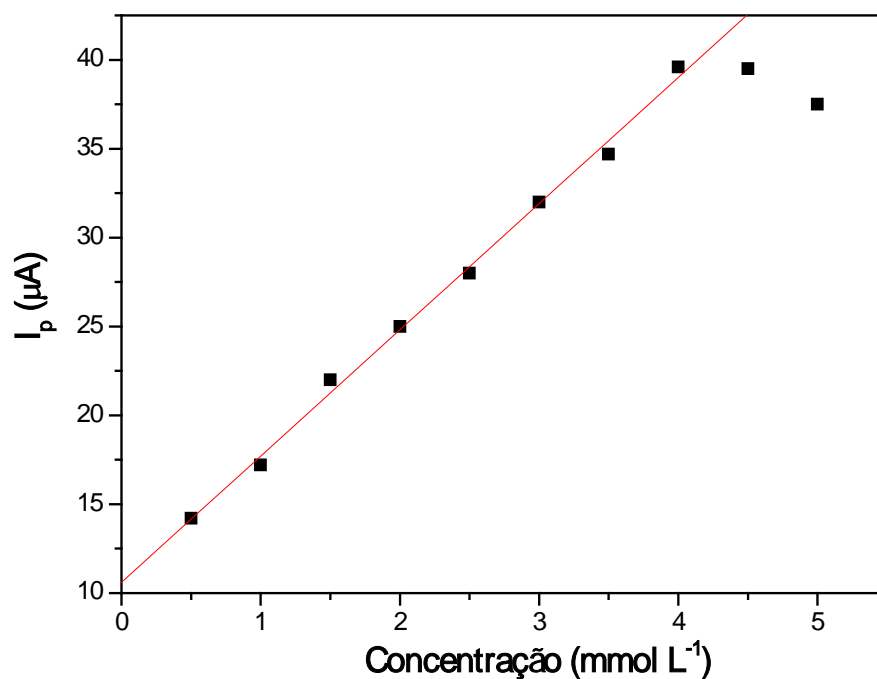


Figura 20 – Efeito da corrente de pico anódica D com a concentração de glicerol ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 0,500 - 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).

Desta forma, para a construção de uma curva analítica, as concentrações ideais de glicerol para o eletrodo com área de $0,125 \text{ cm}^2$ encontram-se em um intervalo de concentração menor que $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para o pico A e $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para o pico D.

Em concentração de ácido perclórico de $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para o mesmo eletrodo de área $0,125 \text{ cm}^2$, o estudo da variação de concentração de glicerol apresentou uma região linear muito estreita, sendo até 3 mmol L^{-1} para o pico A e até 2 mmol L^{-1} para o pico D. A Figura 21 ilustra a curva analítica de corrente em função da concentração para os picos A e D simultaneamente.

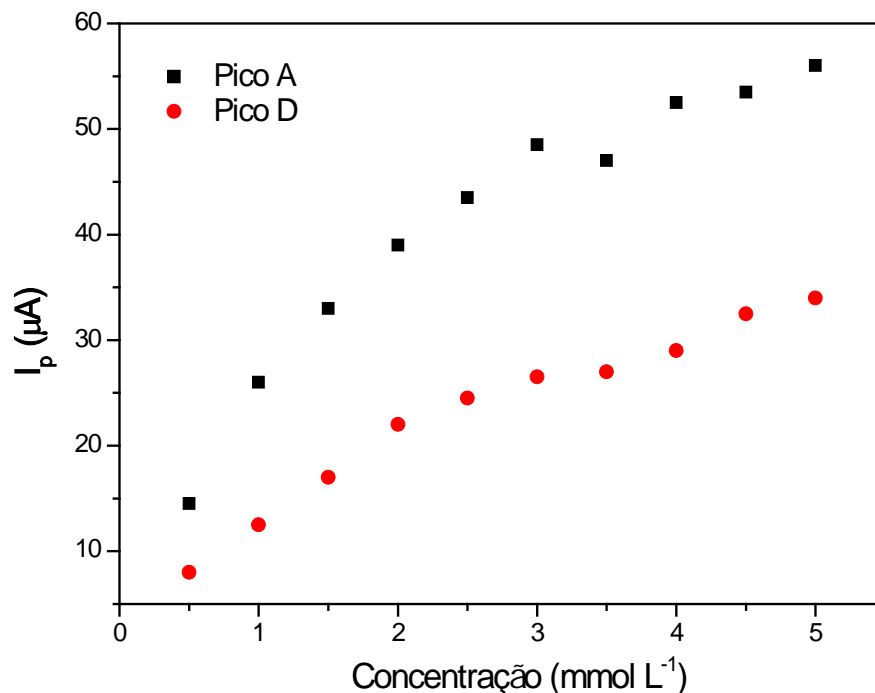


Figura 21 – Efeito da corrente de pico anódica A e D com a concentração de glicerol ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 50,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 0,500 - 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 7$).

Desta forma, optou-se por adotar como ideal a concentração de ácido perclórico de 100 mmol L^{-1} para as determinações quantitativas de glicerol, mantendo-se, portanto, uma concentração de eletrólito com duas ordens de grandeza maior que a do analito. Apesar da intensidade de ambos os picos, A e D, serem proporcionais ao aumento de concentração de glicerol, somente o pico A foi escolhido para as determinações quantitativas devido a este ser mais bem definido e mais sensível em concentrações menores.

4.4 Estudo de estabilidade

Durante algumas etapas de validação, foram verificados problemas relativos à estabilidade dos sinais de corrente de pico obtidos. Estes problemas tornaram-se mais evidentes durante a análise de amostras de glicerol extraídas de biodiesel após um longo período de tempo, que implicam em um longo repouso entre as medidas eletroquímicas. A partir do voltamograma da Figura 22 é possível observar a estabilidade do sinal ao longo do tempo. Antes de cada análise, foram feitos 10 ciclos sucessivos voltamétricos e registrado apenas o último voltamograma.

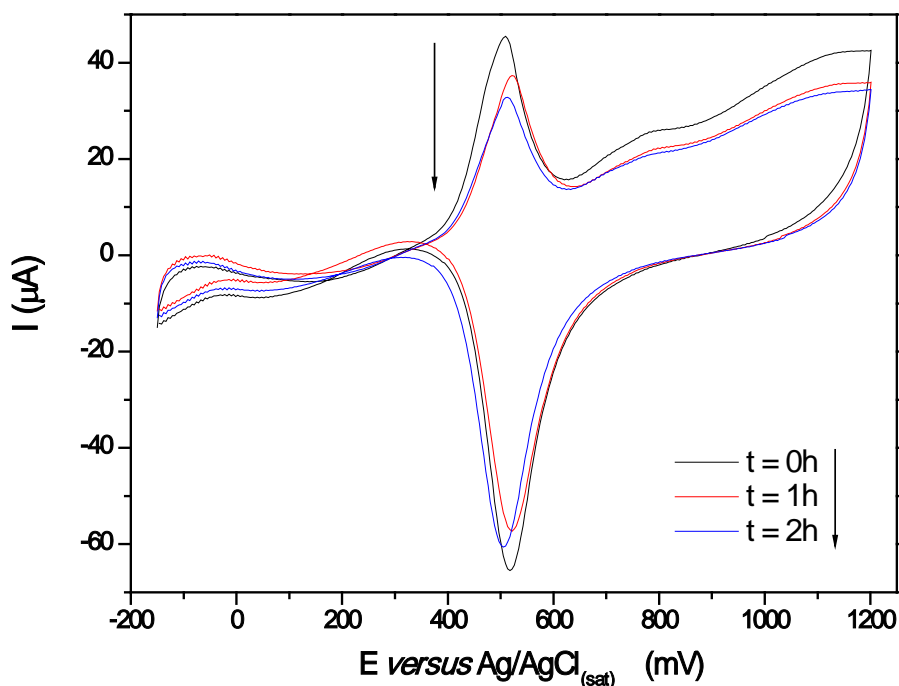


Figura 22 – Voltamogramas para estudos de estabilidade ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 1,08 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 10$; $t = 0 - 2 \text{ h}$).

Um dos fatores que se mostrou muito importante para a estabilidade do sinal eletroquímico obtido foi a realização dos ciclos sucessivos voltamétricos. O número de ciclos, seja durante o procedimento de ativação da superfície do eletrodo de

platina ou durante as análises, mostrou-se essencial para uma maior estabilidade do sinal de oxidação do glicerol. Igualmente importante é a realização dos ciclos sucessivos voltamétricos em uma solução de ácido perclórico contendo a mesma concentração analítica da amostra que contém o analito de interesse.

A Figura 23 mostra quatro voltamogramas em um período de 14 horas, onde foram feitos 100 ciclos sucessivos voltamétricos antes do registro de cada voltamograma.

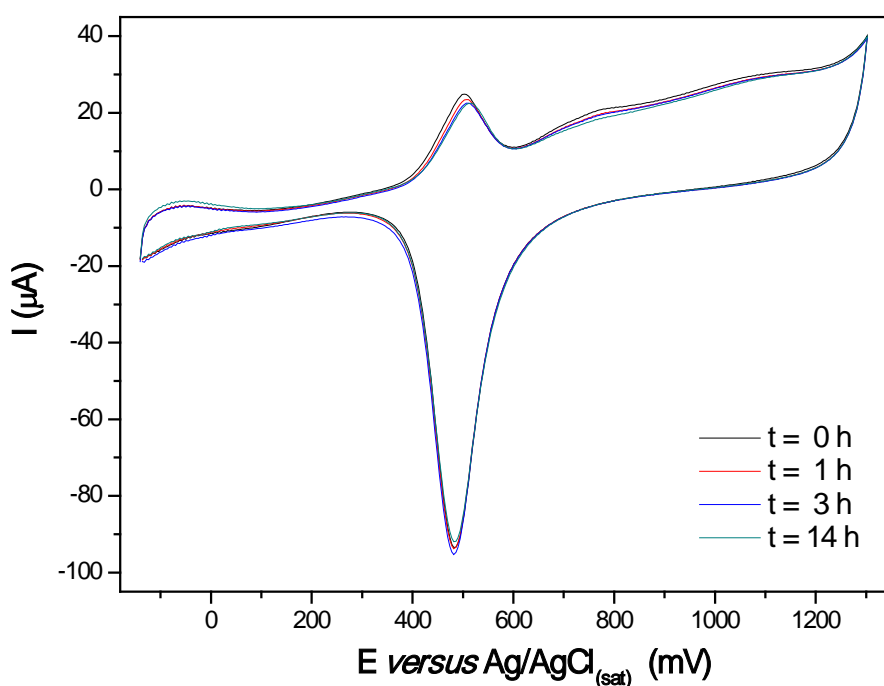


Figura 23 – Voltamogramas para estudos de estabilidade ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 0,195 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 100$; $t = 0 - 14 \text{ h}$).

Assim, observou-se que, o aumento do número de ciclos sucessivos voltamétricos antes do registro do último voltamograma, traz como benefício um incremento de estabilidade de sinal em função do tempo.

A estabilidade do sinal alcançada é essencial para a elaboração de curvas analíticas, possibilitando uma curva analítica com maior linearidade e reprodutibilidade.

Observou-se que há duas maneiras de se alcançar estabilidade para os sinais de corrente obtidos, sendo a primeira, realizando uma pré-ativação do eletrodo em uma solução de ácido perclórico separada (de mesma concentração de ácido presente na amostra contendo glicerol), conforme descrito anteriormente (ver 3.2) e, a segunda, realizando o aumento do número de ciclos sucessivos voltamétricos na amostra a ser analisada contendo glicerol. Esta última maneira contribuiu para a simplificação do método. Neste momento, fez-se necessário uma melhor avaliação da quantidade de ciclos sucessivos voltamétricos que deveriam ser realizados antes do registro do último voltamograma. Na Figura 24, está ilustrado este comportamento.

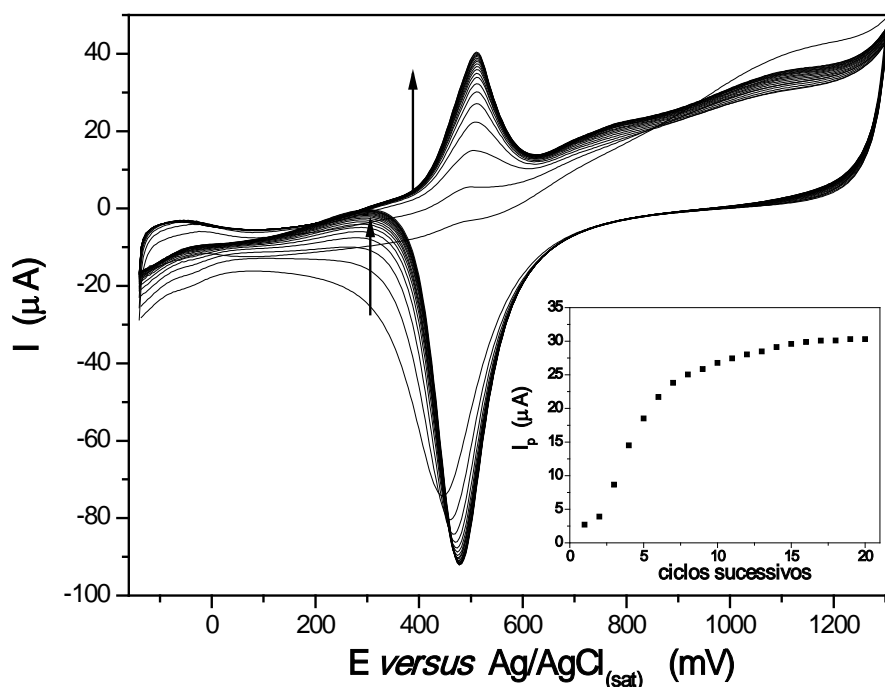


Figura 24 – Voltamogramas sucessivos ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 1,08 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; flechas indicam aumento do nº de ciclos).

Observa-se que, ao longo dos ciclos sucessivos voltamétricos, há um aumento de intensidade de corrente para o pico A, atingindo estabilidade após 20 ciclos sucessivos. Pode-se ainda notar que, no primeiro ciclo voltamétrico, na concentração

de glicerol estudada, os picos A e D, anteriormente descritos, não podem ser visualizados. O fenômeno responsável pelo aumento de intensidade de corrente dos picos de oxidação em função do número de ciclos sucessivos voltamétricos está provavelmente relacionado com o crescimento de óxidos na superfície do eletrodo de platina em presença de glicerol.

A formação de óxidos de platina pela técnica de varredura cíclica sucessiva entre limites críticos de potencial foi investigada inicialmente, para fins qualitativos, por Burke e Roche¹⁷⁶. Os autores realizaram as medidas em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ entre os potenciais de 0 e 1,6 V *versus* ERH. Como conclusão, os autores relataram que a técnica de varredura cíclica de potencial é a mais efetiva para o crescimento de multicamadas de óxidos. Segundo estes autores, uma das maiores vantagens do crescimento de uma camada de óxidos sob condições de varredura cíclica de potencial está na eliminação da necessidade de se realizar um pré-tratamento abrasivo, no qual era necessário gerar um estresse mecânico na superfície do eletrodo de platina (pressionando lixa) para observar o crescimento do filme de óxidos. Os autores explicam que a habilidade de formação do filme de óxidos nestas condições sem a necessidade de gerar um estresse na superfície do eletrodo é devida ao fato que a formação e subsequente redução da monocamada de filmes permitem que os átomos do metal, na superfície da platina, fiquem em um estado perturbado. Na subsequente reoxidação, a camada compacta de óxidos é regenerada pela oxidação da estrutura principal subjacente do metal, enquanto que os átomos de platina dispersos são completamente oxidados e convertidos possivelmente em um estado hídrico, durante esta repetida oxidação e redução em uma compacta interface de óxidos hídricos¹⁷⁶.

Antes de cada medida realizada em amostras contendo glicerol, uma nova aplicação dos ciclos sucessivos voltamétricos faz-se necessária, uma vez que a facilidade de reoxidação decai rapidamente se o eletrodo reduzido é deixado em circuito aberto por qualquer tempo. Fato este também observado por James em óxido de platina¹⁸².

Sendo assim, as condições eletroquímicas estabelecidas para as análises quantitativas são:

Número de ciclos: 20

Potencial inicial: -140 mV

Potencial de volta: +1300 mV

Segundo potencial de volta: -140 mV

Passo de potencial: 4,12 mV

Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹

A varredura cíclica sucessiva de potencial, conhecida popularmente como ativação, é muitas vezes utilizada como uma maneira de efetuar uma limpeza eletroquímica na superfície de eletrodos de ouro e platina.

Tendo em vista que o glicerol se oxida em potenciais próximos a 500 mV *versus* Ag/AgCl_(sat), na ausência de qualquer outro fenômeno catalítico, seria esperado que a mesma intensidade de corrente de pico fosse obtida se o valor máximo de potencial programado fosse de 800 mV ao invés de 1300 mV.

A Figura 25 ilustra voltamogramas cíclicos obtidos em dois intervalos de potenciais, entre -140 e 1300 mV e entre -140 e 800 mV *versus* Ag/AgCl_(sat).

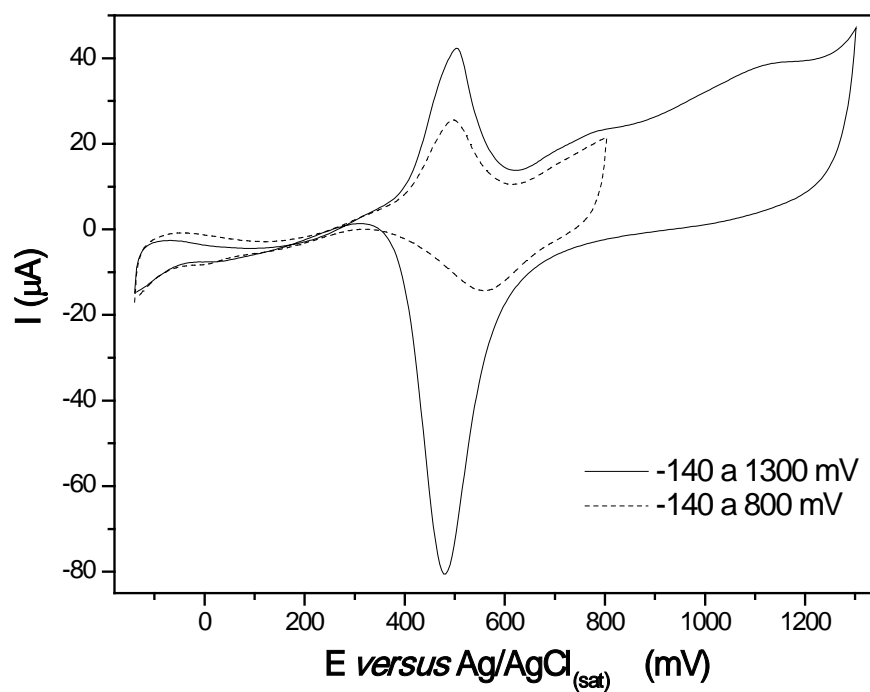


Figura 25 – Influência do potencial limite na oxidação do glicerol ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 1,08 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 20$).

Desta forma, conforme exposto na Figura 25, confirma-se a necessidade da programação cíclica atingir o potencial de 1300 mV *versus* Ag/AgCl_(sat), permitindo que a oxidação do glicerol produza sinais de corrente de pico maiores, com benefícios quantitativos claros.

4.5 Estudo de repetitividade

A fim de verificar a repetitividade do sinal de corrente nas condições previamente otimizadas, preparou-se três amostras contendo 20, 75 e 100 mg L⁻¹ de glicerol em ácido perclórico 100 mmol L⁻¹. Foram realizadas 20 medidas para cada amostra nas condições eletroquímicas estabelecidas como ideais. Os resultados foram:

Amostra com 20 mg L⁻¹:

$$\bar{I}_p = 13,2 \mu\text{A}$$

$$\text{desvio padrão}_{(N-1)} = 0,22$$

$$\text{Limite de confiança}_{95\%} = 13,2 \pm 0,1 \mu\text{A}$$

Amostra com 75 mg L⁻¹:

$$\bar{I}_p = 30,5 \mu\text{A}$$

$$\text{desvio padrão}_{(N-1)} = 0,398$$

$$\text{Limite de confiança}_{95\%} = 30,5 \pm 0,2 \mu\text{A}$$

Amostra com 100 mg L⁻¹:

$$\bar{I}_p = 37,7 \mu\text{A}$$

$$\text{desvio padrão}_{(N-1)} = 0,376$$

$$\text{Limite de confiança}_{95\%} = 37,7 \pm 0,2 \mu\text{A}$$

Observa-se uma boa repetitividade entre os sinais de corrente obtidos pelas amostras padrão de glicerol ao longo de 20 medidas. O intervalo de confiança foi obtido utilizando valores tabelados do parâmetro t de Student¹⁸³ para 20 medidas com 95% de probabilidade.

4.6 Curva analítica

Considerando as melhores condições eletroanalíticas fixadas (ver 4.3), elaborou-se uma curva analítica de glicerol em ácido perclórico 100 mmol L^{-1} conforme descrito anteriormente (ver 3.2). A faixa de concentração escolhida para a elaboração da curva analítica levou em consideração as concentrações de glicerol que poderão ser encontradas em amostras reais de biodiesel pela utilização do método de extração desenvolvido (ver 3.3). Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 26, no qual cada ponto representa a média de três determinações.

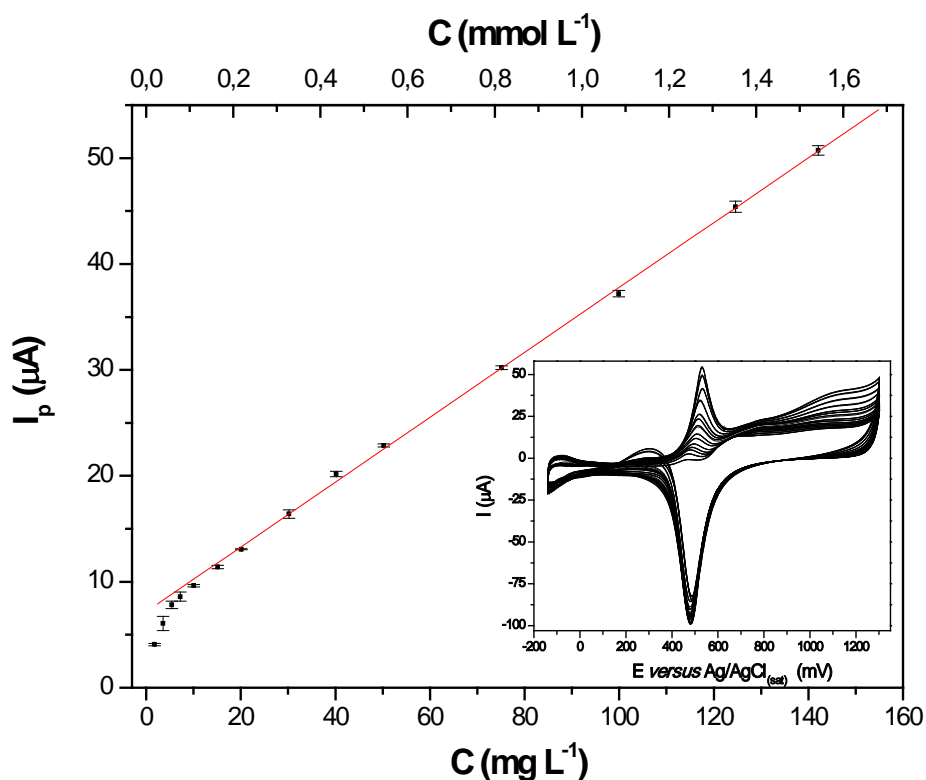


Figura 26 – Curva analítica obtida pelo registro das correntes de pico entre 400 e 800 mV *versus* $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ ($a = 0,125 \text{ cm}^2$; $C_{\text{HClO}_4} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$; $C_{\text{glicerol}} = 1,96 \times 10^{-2} - 1,63 \text{ mmol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $n^\circ \text{ ciclo} = 20$).

Observa-se uma larga região de linearidade entre 15 e 150 mg L^{-1} (0,16 e 1,6 mmol L^{-1}) com $r = 0,9996$ ($n = 9$).

A equação de reta obtida pela aplicação dos mínimos quadrados foi $I_p(\mu A) = 7,16 \pm 0,24 + 0,306 \pm 0,003 \times C(\text{mg L}^{-1})$. A partir da equação de reta, estimou-se um limite de detecção^{††} de $2,3 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,5 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$). A região com concentrações abaixo de 15 mg L^{-1} não apresentou a linearidade necessária para quantificação de glicerol. A quantificação pelo método de padrão externo, ou seja, pela utilização de uma curva analítica, far-se-á necessária, uma vez que a região de linearidade escolhida (acima de 15 mg L^{-1}) não intercepta os eixos de corrente *versus* concentração.

É importante mencionar que a região de linearidade obtida pelo método desenvolvido é reprodutível para os diferentes polimentos na superfície do eletrodo. Todavia, as equações de reta são estritamente válidas para cada superfície específica, ou seja, são particulares de cada processo de polimento. Isto justifica a preparação de uma nova curva analítica quando um novo polimento for necessário.

A faixa de trabalho na unidade mg kg^{-1} (glicerol:biodiesel) depende da massa de biodiesel pesada antes do procedimento de extração, que pode ser alterada conforme a qualidade da amostra ou precisão desejada. Como exemplo, uma faixa de trabalho entre $37,5$ e 375 mg kg^{-1} ou entre $28,0$ e 280 mg kg^{-1} é obtida pelas pesagens de $3,00$ ou $4,00 \text{ g}$ de biodiesel, respectivamente. A equação que relaciona a concentração de glicerol livre em mg L^{-1} com a concentração em mg kg^{-1} , levando em consideração os passos de diluição envolvidos (ver 3.3), é: $C(\text{mg kg}^{-1}) = 15/2 \times C(\text{mg L}^{-1}) / m(\text{g})$, onde m = massa de biodiesel.

Considerando a curva analítica obtida e o método de extração desenvolvido (ver 3.3), onde se empregou 2 g de biodiesel, o intervalo de linearidade entre 15 e 150 mg L^{-1} corresponde à faixa de trabalho entre 56 e 560 mg kg^{-1} (glicerol:biodiesel). Este intervalo compreende uma ampla faixa de concentração com valores bem acima e abaixo dos máximos tolerados pelas agências reguladoras, que é de 200 mg kg^{-1} .

^{††} **Limite de detecção (LD):** Definido como a concentração analítica que gera uma resposta com um fator de confiança k superior ao desvio padrão do branco, S_b , de acordo com a equação: $LD = kS_b/m$. Onde m é a sensibilidade da calibração e o fator k é escolhido como 3 para 98% de confiança. Para o caso específico, o LD foi estimado a partir do cálculo $3 \times 0,24/0,306$. Sendo $0,24$ o desvio padrão do coeficiente linear da reta de regressão e $0,306$ o coeficiente angular da curva analítica média.

4.7 Desenvolvimento de método de extração de glicerol em biodiesel

Nesta etapa do trabalho aplicaram-se as melhores condições eletroanalíticas previamente estabelecidas nas análises de amostras de biodiesel tipo B100 (oriundo de óleo de soja). Para isso, fez-se necessário um minucioso estudo a fim de se unir a melhor extração do glicerol contido no biodiesel sem que este processo implicasse na adição de interferentes ao método eletroanalítico, tais como alcoóis e hexano, frequentemente utilizados por outros autores.

Os primeiros testes tiveram como modelo as extrações realizadas por Lozano e colaboradores¹²⁶, onde uma separação do tipo líquido-líquido foi realizada para extrair o glicerol contido no biodiesel. O método empregado pelos autores consiste na pesagem de 4 g de biodiesel (contendo cerca de $300 \mu\text{g g}^{-1}$ de glicerol, ou 300 mg kg^{-1}), transferência para um frasco volumétrico e, em seguida, adição de 45 g de água deionizada e 50 mL de hexano. Agita-se a mistura por 30 min em um banho à temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e, em seguida, os frascos volumétricos são deixados em repouso por 2 h à temperatura ambiente, para que a separação de fases ocorra. A fase aquosa, contendo glicerol, é extraída por meio de uma seringa dotada de filtro de *nylon* hidrofílico e, logo em seguida, injetada diretamente na coluna cromatográfica. A presença do filtro de *nylon*, segundo os autores, tem como objetivo impedir que qualquer hexano seja injetado na coluna cromatográfica.

Uma adaptação do método de extração de Lozano foi adotada, porém, sem a presença do filtro de *nylon*.

Inicialmente a fase aquosa extraída era levada a um rotoevaporador para que todo hexano fosse separado. Os resultados mostraram-se insatisfatórios em todos os casos, pois a detecção do glicerol por via eletroquímica tornava-se impossível mesmo com a adição do padrão de glicerol puro diretamente à célula eletroquímica que continha glicerol extraído do biodiesel. Isso evidenciou a existência de algum interferente à detecção eletroquímica além de hexano.

Conhecendo-se todo o processo industrial de obtenção e purificação de biodiesel e seus principais contaminantes remanescentes, cogitou-se a hipótese do

interferente ser algum sabão residual (carboxilato), acilgliceróis ou AG de pequena cadeia carbônica, que são igualmente solúveis na fase aquosa.

Para solucionar este problema, uma etapa adicional de extração em fase sólida foi inserida no processo de extração e a etapa de rotoevaporação eliminada. Sendo assim, uma alíquota da fase aquosa, obtida anteriormente após extração líquido-líquido com hexano:água, foi eluída em um cartucho do tipo C18 e, em seguida, o volume de amostra obtido foi acidificado a uma concentração final de ácido perclórico de 100 mmol L^{-1} .

Esta modificação do método de Lozano mostrou-se adequada e eficiente para a realização das medidas eletroquímicas nas condições anteriormente estudadas, possibilitando a eliminação de interferentes que impediam a oxidação do glicerol na superfície do eletrodo de platina.

Outros inconvenientes foram encontrados durante as etapas de validação para o método modificado, pois, após inúmeros testes, verificou-se que, após a inserção da etapa de extração em fase sólida, passou a existir um pequeno sinal residual que se somava ao sinal do analito de interesse (glicerol).

Foi investigada a possibilidade de interferência por parte de ftalatos, oriundos da dissolução do invólucro dos cartuchos de C18 por solventes orgânicos, porém, tal suspeita foi eliminada após a confecção de um cartucho contendo a sílica-C18 com invólucro de vidro.

Tendo em vista que alcoóis como etanol e metanol se oxidam em potenciais muito próximos ao glicerol e que os cartuchos de C18 estavam sendo ativados com metanol e, logo em seguida, com água, foi aumentada a quantidade de água utilizada para enxaguar os cartuchos após este processo de ativação.

Mesmo após a eluição de 500 mL de água ainda foi possível detectar por via eletroquímica um sinal residual referente ao metanol, o que comprometia a detecção do glicerol em concentrações baixas.

A substituição de metanol por acetona foi uma medida paliativa que visava contornar este inconveniente, pois, o mesmo sinal anteriormente detectado ainda persistia, só que em intensidade menor e significativamente interferente. Tal sinal é

explicado pela presença de metanol como contaminante do solvente acetona, mesmo em pureza analítica, e pela alta sensibilidade do eletrodo de platina ao metanol.

Provavelmente os silanóis residuais presentes na sílica ligada a grupamentos de 18 carbonos retém alcoóis, os quais são eliminados gradativamente durante a eluição com água. Tais traços de alcoóis podem ser facilmente detectados pelo método eletroquímico desenvolvido.

Tendo em vista que o metanol possui baixo ponto de ebulição e que o glicerol apresenta um ponto de ebulição da ordem de 260 °C à pressão normal, uma etapa de rotoevaporação mostrou-se suficiente para separar o interferente oriundo do processo de extração em fase sólida utilizado. Tal etapa consome um tempo aproximado de 7 min para uma amostra de 5 mL do eluído até aproximadamente a secura a uma pressão de 200 mmHg (267 mbar ou 26,7 kPa) e temperatura de 80 °C.

Hájek e colaboradores¹²⁵ utilizaram uma etapa semelhante em seu método com o objetivo de concentrar sua amostra. Segundo esses autores, não há perda de glicerol após esta etapa.

A fim de contornar a utilização do hexano na extração líquido-líquido, estudou-se a viabilidade de se utilizar apenas água:biodiesel na extração. Experimentalmente verificou-se que a agitação de uma mistura contendo apenas água e biodiesel B100 está muito mais sujeita à formação de emulsões do que uma mistura contendo hexano:biodiesel e água para amostras de biodiesel com alto teor de sabões (comuns no Brasil).

Tendo em vista que o glicerol é miscível em água, bastaria apenas uma boa separação entre as fases para que o solvente hexano fosse substituído por água.

A extração de glicerol com apenas água foi realizada por Hájek e colaboradores¹²⁵ em um sistema que permite uma boa separação das fases após um tempo de 2 h. Os autores demonstraram que, em uma única etapa de extração, foi possível extrair praticamente todo o glicerol contido no biodiesel (99,8%), bastando apenas uma agitação eficiente que, no caso específico, ocorreu pelo borbulhamento de ar neste sistema.

Em outro trabalho, Bondioli e Bella⁵⁸ executaram o processo de extração de glicerol em biodiesel através de um agitador de tubos de ensaio (*vortex*) e uma centrífuga, com os solventes água:etanol e hexano.

Sabendo-se que o limite de detecção alcançado pelo método eletroanalítico desenvolvido no presente trabalho é pequeno, isto permite que uma pequena quantidade de massa de biodiesel tipo B100 seja utilizada. Sendo assim, uma adaptação do método utilizado por Bondioli e Bella possibilitou eliminar a utilização de hexano, pois com um *vortex*, a agitação com apenas água mostra-se viável e eficiente, e ainda permitiu a utilização da centrífuga, que traz como benefício uma melhor separação das fases orgânica/aquosa além do reduzido tempo de espera (10 min) para que a separação de fases ocorra. A Figura 27 ilustra o fluxograma para o método de extração desenvolvido.

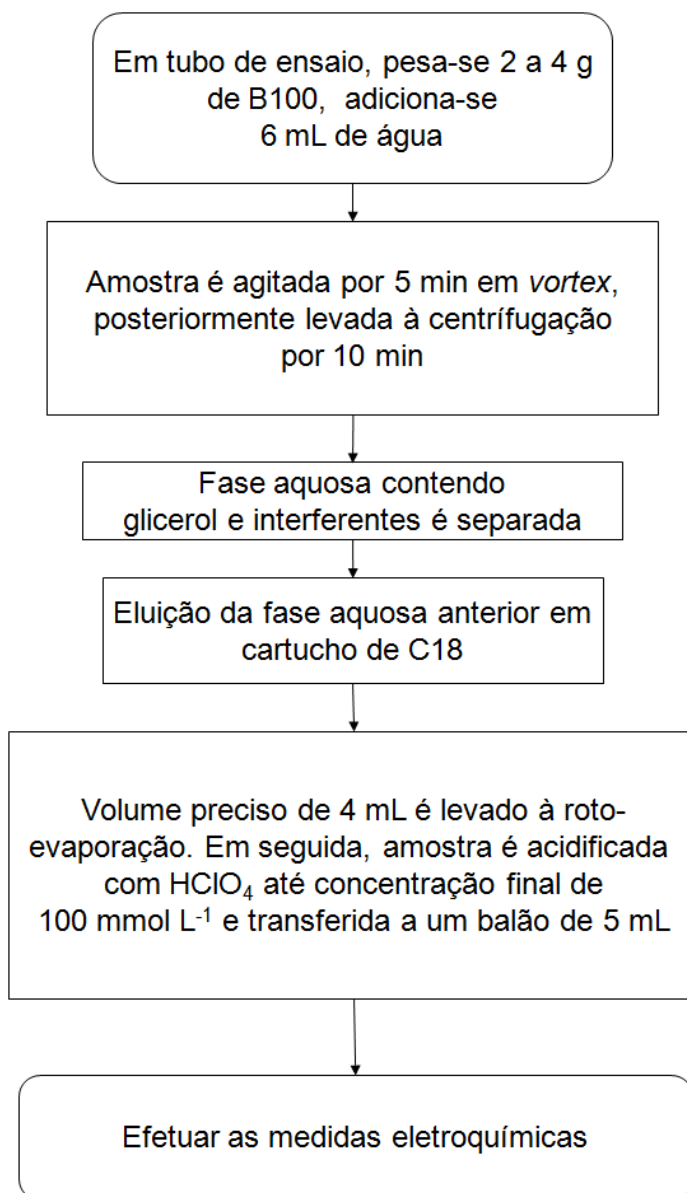


Figura 27 – Fluxograma indicando o processo de extração desenvolvido.

4.7.1 Teste de recuperação no processo de rotoevaporação

A fim de verificar se a rotoevaporação ocasiona perda de glicerol, foi realizado um teste com quantidades conhecidas de glicerol.

Foram preparadas nove amostras teste (três amostras com diferentes concentrações em triplicata), e levadas diretamente ao rotoevaporador pela transferência de quantidades de solução estoque de glicerol, de tal forma a se ter, após todo processo de concentração e posterior transferência quantitativa para um balão volumétrico de 5,00 mL, concentrações de glicerol de 35, 70 e 100 mg L⁻¹ em ácido perclórico 100 mmol L⁻¹. O processo de rotoevaporação seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente (ver 3.3).

Antes da realização das medidas, o eletrodo de trabalho passou pelas etapas de limpeza e ativação (ver 3.2) e, logo em seguida, foi construída uma curva analítica na faixa de concentração de 15 a 150 mg L⁻¹. Os resultados obtidos estão reunidos na Tabela 4.

Tabela 4 – Determinação das concentrações de glicerol após rotoevaporação

	Concentração esperada	Concentração obtida	Erro relativo médio (%)
Concentração de glicerol (mg L⁻¹)	34,9	28±5	19,8
	69,5	67±5	3,6
	100	100±4	0

Os resultados mostram erros relativos menores para amostras com concentrações maiores de glicerol. Os erros encontrados podem ser atribuídos ao manuseio e diluições.

4.8 Determinação de glicerol livre em biodiesel

Três alíquotas de 2 g de biodiesel contendo uma quantidade conhecida de glicerol, preparadas conforme descrito em 3.4.2, foram submetidas ao procedimento de extração desenvolvido (ver 3.3). Os procedimentos eletroanalíticos (ver 3.2) foram realizados paralelamente aos procedimentos anteriormente mencionados, de tal forma a obter uma curva analítica com equação de reta $I_p(\mu A) = 1,01 \pm 0,50 + 0,295 \pm 0,007 \times C(\text{mg L}^{-1})$ e $r = 0,9995$. Os resultados obtidos estão ilustrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Determinação de glicerol livre em uma matriz com concentração conhecida de glicerol

	Concentração esperada	Concentração obtida	Recuperação média
glicerol livre (mg L⁻¹)	42,7	46±4	
glicerol livre (mg kg⁻¹)[*]	160	171±15	107%
glicerol livre (%m)	0,0160	0,017±0,002	

^{*} $C(\text{mg kg}^{-1}) = 15/2 \times C(\text{mg L}^{-1})/m(\text{g})$, onde m = massa de biodiesel.

Os resultados mostram que o método desenvolvido é eficiente para a determinação de glicerol livre contido no biodiesel.

5 CONCLUSÕES

Um novo método eletroanalítico foi desenvolvido para a determinação de glicerol livre em biodiesel baseado em sua oxidação em eletrodos de platina.

Nos procedimentos eletroanalíticos, a utilização dos ciclos sucessivos voltamétricos (técnica de varredura sucessiva de potencial) possibilitou a detecção de glicerol em concentrações bem menores que as obtidas por um simples ciclo voltamétrico. As condições analíticas empregadas foram: concentração analítica de ácido perclórico de 100 mmol L^{-1} , velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} e realização de 20 ciclos sucessivos voltamétricos entre os potenciais de -140 e $1300 \text{ mV versus Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$.

O método eletroanalítico mostrou repetitividade (precisão) e estabilidade, permitindo a determinação de glicerol em um grande número de amostras sem a necessidade de recalibração. A partir dos resultados obtidos foi possível estimar um limite de detecção de $2,3 \text{ mg L}^{-1}$, comparável àqueles obtidos pelas técnicas de GC e HPLC.

Além do método eletroanalítico, foi desenvolvido um método de extração rápido, eficiente e ecologicamente correto, uma vez que faz uso de uma extração do tipo líquido-líquido com apenas água (biodiesel:água) e uma simples etapa de extração em fase sólida utilizando cartuchos de C18, ativados com acetona e água. A extração em fase sólida mostrou grande eficiência ao separar os interferentes orgânicos ao método eletroanalítico e, a rotoevaporação, mostrou-se capaz de separar traços de metanol naturalmente presentes no solvente acetona sem que ocasionasse perda do glicerol extraído.

O método eletroanalítico desenvolvido apresenta uma linearidade entre 15 e 150 mg L^{-1} ($0,16$ e $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio aquoso, que compreende uma faixa de trabalho de 56 a 560 mg kg^{-1} (glicerol:biodiesel) quando uma massa de biodiesel de 2 g é empregada na extração, apresentando, portanto, uma ampla faixa de trabalho com valores de concentração bem abaixo e acima dos máximos tolerados pelas agências reguladoras (200 mg kg^{-1}).

Desconsiderando os tempos de preparação do eletrodo de platina, ativação e construção de curva analítica (ca. 75 min), que são realizados paralelamente aos procedimentos de extração de glicerol do biodiesel, manuseio de amostras e determinações eletroanalíticas, todo o procedimento desenvolvido consome, em triplicata, um tempo de 80 min. Embora o procedimento desenvolvido neste trabalho compreenda vários estágios, o tempo de análise é relativamente curto quando comparado àqueles que se utilizam da GC, que consomem tempos próximos a 30 min para uma única análise por corrida cromatográfica^{63,109}.

REFERÊNCIAS^{§§}

1 MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. **Renew. Sustain. Energ. Rev.**, Amsterdam, v. 10, p. 248-268, June 2006. doi:10.1016/j.rser.2004.09.002.

2 PARENTE, E. J. de S. **Biodiesel**: uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza: Unigráfica, 2003. Disponível em: <<http://www.balcom.org.br:8080/trade/upload/1189381129469503743.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2009.

3 CARDOSO, A. A.; MACHADO, C. M.; PEREIRA, E. A. Biocombustível, o mito do combustível limpo. **Quím. Nova Esc.**, São Paulo, n. 28, p. 9-14, maio 2008. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc28/03-QS-3207.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2009.

4 BRASIL. Câmara dos Deputados. Consultoria Legislativa. **O biodiesel e a inclusão social**. Disponível em: <http://www2.camara.gov.br/publicacoes/estnottec/pdf/2004_676_Estudo.pdf>. Acesso em: 20 maio 2009.

5 DIESEL, R. **Die entstehung des diesel motors**. Berlin: Julius Springer, 1913. 158 p.

6 KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de biodiesel**. Tradução de Luiz Pereira Ramos. São Paulo: Edgard Blücher, 2008. 340 p.

7 DIESEL, E. **Diesel – Der Mensch – Das Werk – Das Schicksal, Hanseatische Verlagsgesellschaft**. 2 Aufl. Hamburgo: Hanseatische Verlagsanstalt, 1937. 492 p.

8 NITSKE, W. R.; WILSON, C. M. **Rudolf Diesel, pioneer of the age of power**. Norman: University of Oklahoma Press, 1965. 318 p.

9 DIESEL, R. The diesel oil engine. **Engineering**, London, v. 93, p. 395-406, 1912.

10 DIESEL, R. The diesel oil-engine and its industrial importance particularly for Great Britain. **Proc. Inst. Mech. Eng.**, London, p. 179-280, 1912.

11 BRAZIL uses vegetable oil for diesel fuel. **Chem. Metall. Eng.**, New York, v. 50, p. 225, 1943.

12 CHANG, C-C.; WAN, S-W. China's motor fuels from tung oil. **J. Ind. Eng. Chem.**, Washington, v. 39, p. 1543-1548, 1947.

13 CHENG, F-W. China produces fuels from vegetable oils. **Chem. Metall. Eng.**, New York, v. 52, p. 99, 1945.

^{§§} De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- 14 OTTO, R. B. Gasoline derived from vegetable oils. **Bol. Divulg. Inst. Óleos**, Rio de Janeiro, n. 3, p. 92, 1945.
- 15 BORGES, G. P. Use of Brazilian vegetable oils as fuel. **Anais Assoc. Bras. Quím.**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 206-209, 1944.
- 16 CHOWHURY, D. H.; MUKERJI, S. N.; AGGARWAI, J. S.; VERMAN, L. C. Indian vegetable oils as fuels for diesel engines. **Gas and Oil Power**, London, v. 37, p. 80-85, 1942.
- 17 HUGUENARD, C. M. **Dual fuel diesel engines using cottonseed oil**. 1951. Thesis (Master of Science) - Ohio State University, Columbus, 1951.
- 18 TU, C-M.; KU, T-T. Cottonseed oil as a diesel oil. **J. Chem. Eng. China**, Tientsin, v. 3, p. 211-221, 1936.
- 19 LEM, R. F-A. **Dual fuel for diesel engines using corn oil with variable injection timing**. 1952. Thesis (Master of Science) - Ohio State University, Columbus, 1952.
- 20 MARTINEZ DE VEDIA, R. Vegetable oils as diesel fuels. **Diesel Power Diesel Transp.**, v. 22, p. 1298-1301, 1944.
- 21 SUEN, T-J.; LI, L-H. Miscibility of ethyl alcohol and vegetable gasoline. **J. Chin. Chem. Soc.**, Beijing, v. 8, p. 76-80, 1941.
- 22 JALBERT, J. Colonial motor fuels and lubricants from plants. **Carburants Nat.**, v. 3, p. 49-56, 1942.
- 23 PHYSICAL CHEMISTRY RESEARCH CO. (France). **Perfectionnements apportés au traitement des matières végétales oléagineuses**. FR 756544, 9 sept. 1932, 11 déc. 1933.
- 24 PHYSICAL CHEMISTRY RESEARCH CO. (France). **Perfectionnements apportés au traitement pyrogéné des matières oléagineuses, d'origine végétale ou animale**. FR 767362, 11 avril 1933, 17 juil. 1934.
- 25 Édouard Georges Marie Romain Legé. **Procédé de transformation des matières grasses et oléagineuses**. FR 812006, 03 janv. 1936, 28 avril 1937.
- 26 James W. Jean. **Motor fuels**. US 2117609, 15 May 1936, 17 May 1938.
- 27 STANDARD OIL DEVELOPMENT CO. (United States). **An improved manufacture of motor fuels**, GB 508913, 06 July 1938, 07 July 1939.

- 28 Marie Michel Joseph Bouffort. **Transformation directe des huiles et corps gras en pétroles et essences sous l'action de la chaleur, de l'aldéhyde formique ou de ses générateurs, de la chaux sodée ou potassée.** FR 844105, 01 sept. 1938, 19 juil. 1939.
- 29 Howard R. W. ARCHER. **Coconut products.** AU 113672, 13 Aug. 1941.
- 30 AMRUTE, P. V. Ground-nut oil for diesel engines. **Australas. Eng.**, Sydney, p. 60-61, 1947.
- 31 Charles Georges Chavanne. **Procédé de transformation d'huiles végétales en vue de leur utilisation comme carburants.** BE 422877, 28 juin 1937, 31 août 1937.
- 32 CHAVANNE, G. A method of possible utilization of palm oil for the manufacture of a heavy fuel. **Bull. Soc. Chim.**, Paris, v. 10, p. 52-58, 1943.
- 33 VAN DEN ABEELE, M. Palm oil as raw material for the production of a heavy motor fuel. **Bull. Agr. Congo Belge**, Cairo, v. 33, p. 3-90, 1942.
- 34 ONIGA, T.; BARRETO, A. J. B. New Brazilian vegetable oils. **Inf. INT**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 21, p. 3-8, 1979.
- 35 NARASIMHAN, T. L.; RAO, M. R. K.; HAVEMANN, H. A. Alcohol as principal fuel in high-speed diesel engines. **J. Indian Inst. Sci.**, Bangalore, v. 38b, p. 224-247, 1956.
- 36 José de Sá Parente. **Processo de produção de um combustível sucedâneo de óleo tipo diesel.** BR n. PI 8004358, 14 jul. 1980, 07 jul. 1981.
- 37 José de Sá Parente. **Processo de produção de combustíveis a partir de frutos ou sementes oleaginosas.** BR n. PI 8007957, 05 dez. 1980, 07 jul. 1981.
- 38 GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; NASTARI, P. M.; LUCON, O. Ethanol learning curve-the Brazilian experience. **Biomass Bioenergy**, Oxford, v. 26, p. 301-304, Mar. 2004. doi:10.1016/S0961-9534(03)00125-9.
- 39 BRASIL. Ministério de Indústria e Comércio. Secretaria de Tecnologia Industrial; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais.** Belo Horizonte, 1983. Relatório final. 2 v.
- 40 SUGIMOTO, L. Programa de biodiesel traz equívocos a partir da fonte. **Jornal da UNICAMP**, Campinas, 9-15 ago. 2004. p. 8. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/ju261pag08.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2009.
- 41 SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. 70º aniversário do biodiesel em 2007: evolução histórica e situação atual no Brasil. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 2068-2071, dez. 2007. doi:10.1590/S0100-40422007000800046.

42 SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 199-210, May 1998. doi:10.1590/S0103-50531998000300002.

43 FUNDAÇÃO TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA (Brasil). Leopoldo Hartman. **Processo de extração de óleos vegetais para obtenção de combustíveis**. BR n. PI 8003739, 30 maio 1980, 16 fev. 1982.

44 Ulf Friedrich Schuchardt; Osvaldo Candido Lopes. **Reator contínuo com catalisadores orgânicos heterogeneizados para transesterificação de óleos vegetais**. BR n. PI 8202429 A, 23 abr. 1982, 29 nov. 1983.

45 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Brasil). Rosa Rabinovitci Szpiz; Fany Hechtman Jablonka; Dalva Alves Pereira; Regina Celi Araujo Lago; Leopold Hartman. **Processo da transesterificação de óleos vegetais**. BR n. PI 8300429, 28 jan. 1983, 04 set. 1984.

46 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Brasil). Rosa Rabinovitci Szpiz; Fany Hechtman Jablonka; Dalva Alves Pereira; Leopold Hartman. **Processo de extração de óleos vegetais com álcool etílico, seguido por transesterificação com este álcool para obtenção de combustíveis**. BR n. PI 8302341, 5 maio 1983, 11 dez. 1984.

47 VIGLIANO, R. Combustível socialmente correto: governo investe no energético para levar emprego ao campo. **Bras. Energ.**, Rio de Janeiro, v. 274, p. 54-56, 2003.

48 GRUPO DE TRABALHO INTERMINISTERIAL. **Apresenta estudos sobre a viabilidade de utilização de óleo vegetal - biodiesel como fonte alternativa de energia e apresenta as ações necessárias para o uso do biodiesel**. Brasília, 2003. Relatório Final. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/relatoriofinal.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2009.

49 PROGRAMA NACIONAL DE PRODUÇÃO E USO DE BIODIESEL. **Apresenta os objetivos e diretrizes do PNPB**. Brasília, DF, 2004. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/programa.html>>. Acesso em: 26 abr. 2009.

50 BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 jan. 2005. Seção 1, p. 8.

51 BRASIL. Agência Nacional do Petróleo. Resolução nº 42, de 24 de novembro de 2004. Especificação do biodiesel, consoante as disposições contidas no Regulamento Técnico nº 4/2004, que poderá ser adicionado ao óleo diesel em proporção de 2%, para comercialização pelos diversos agentes econômicos autorizados em todo o território nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 dez. de 2004. Seção 1, p. 53. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/Resolucao_42.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2009.

52 BRASIL. Agência Nacional do Petróleo. Resolução nº 7 de 19 de março de 2008. Estabelece a especificação do biodiesel, consoante as disposições contidas no Regulamento Técnico nº 1/2008, a ser adicionado ao óleo diesel, para comercialização pelos diversos agentes econômicos autorizados, em todo o território nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 mar. de 2008. Seção 1, p. 37. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml>. Acesso em: 26 abr. 2009.

53 WANG, R. Development of biodiesel fuel. **Taiyangneng Xuebao**, Beijing, v. 9, n. 4, p. 434-436, 1988.

54 BAILER, J.; HUEBER, K. de. Determination of saponifiable glycerol in "bio-diesel". **Fresenius J. Anal. Chem.**, Berlin, v. 340, n. 3, p. 186, Mar. 1991. doi:10.1007/BF00324480

55 SUPPES, G. J.; DASARI, M. A.; DOSKOCIL, E. J.; MANKIDY, P. J.; GOFF, M. J. Transesterification of soybean oil with zeolite and metal catalysts. **Appl. Catal., A**, Amsterdam, v. 257, n. 2, p. 213-223, Jan. 2004. doi:10.1016/j.apcata.2003.07.010.

56 KOMERS, K.; STLOUKAL, R.; MACHEK, J.; SKOPAL, F.; KOMERSOVÁ, A. Biodiesel fuel from rapeseed oil, methanol, and KOH. Analytical methods in research and production. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, Weinheim, v. 100, n. 11, p. 507-512, 1998. doi:10.1002/(SICI)1521-4133(199811)100:11%3C507::AID-LIPI507%3E3.0.CO;2-6.

57 FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Berlin, v. 61, n. 10, p. 1638-1643, Oct. 1984. doi:10.1007/BF02541649.

58 BONDIOLI, P.; BELLA, L. D. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, Weinheim, v. 107, n. 3, p. 153-157, 2005. doi:10.1002/ejlt.200401054.

59 MITTELBAACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: specifications and quality control of biodiesel. **Bioresour. Technol.**, New York, v. 56, n. 1, p. 7-11, Apr. 1996. doi:10.1016/0960-8524(95)00172-7.

60 GRABOSKI, M. S.; McCORMICK, R. L. Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. **Prog. Energy Combust. Sci.**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 125-164, 1998. doi:10.1016/S0360-1285(97)00034-8.

61 CORRÊA, S. M.; ARBILLA, G. Carbonyl emissions in diesel and biodiesel exhaust. **Atmos. Environ.**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 769-775, Feb. 2008. doi:10.1016/j.atmosenv.2007.09.073.

62 Armin Neher; Thomas Hass; Dietrich Arntz; Herbert Klenk; Walter Girke. **Preparation of acrolein**. DE 4238493, 14 Nov. 1992, 21 Apr. 1994.

- 63 MITTELBACH, M.; ROTH, G.; BERGMANN, A. Simultaneous gas chromatographic determination of methanol and free glycerol in biodiesel. **Chromatographia**, Braunschweig, v. 42, n. 7/8, p. 431-434, Apr. 1996. doi:10.1007/BF02272135.
- 64 KNOTHE, G. Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel. **Trans. ASAE**, St. Joseph, v. 44, n. 2, p. 193-200, 2001. Disponível em: <http://www.biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/gen/20010101_gen-344.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2009.
- 65 KNOTHE, G. Monitoring a progressing transesterification reaction by fiber-optic near infrared spectroscopy with correlation to ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Berlin, v. 77, n. 5, p. 489-493, May 2000. doi:10.1007/s11746-000-0078-5.
- 66 EDLUND, M.; VISSER, H.; HEITLAND, P. Analysis of biodiesel by argon-oxygen mixed-gas inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, London, v. 17, n. 3, p. 232-235, 2002. doi:10.1039/b111476j.
- 67 NOWKA, R. Determination of alkali metal elements in biodiesel using flame atomic emission spectrometry: a real alternative to ICP-OES. **GIT Labor Fachz.**, Darmstadt, v. 47, n. 5, p. 518-520, 2003.
- 68 WU, M-X.; WU, G-Y.; WANG, J-D.; XUAN, H. Spectrophotometric determination of microamounts of phosphorus in biodiesel fuels by phospho-molybdenum blue. **Jiangsu Gongye Xueyuan Xuebao**, Changzhou, v. 16, n. 2, p. 23-25, 2004.
- 69 KORN, M. das G. A.; SANTOS, D. S. S. dos; SANTANA, D.; WELZ, B.; VALE, M. G. R.; TEIXEIRA, A. P.; LIMA, D. de C.; FERREIRA, S. L. C. Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels – A review. **Talanta**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 1-11, Aug. 2007. doi:10.1016/j.talanta.2007.03.036.
- 70 SANTOS, E. J. dos; HERRMANN, A. B.; CHAVES, E. S.; VECHIATTO, W. W. D.; SCHOEMBERGER, A. C.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Simultaneous determination of Ca, P, Mg, K and Na in biodiesel by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry with internal standardization after multivariate optimization. **J. Anal. At. Spectrom.**, London, v. 22, n. 10, p. 1300-1303, 2007. doi:10.1039/b702563g.
- 71 WOODS, G. D.; FRYER, F. I. Direct elemental analysis of biodiesel by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, Heidelberg, v. 389, n. 3, p. 753-761, Oct. 2007. doi:10.1007/s00216-007-1439-0.
- 72 JESUS, A. de; SILVA, M. M.; VALE, M. G. R. The use of microemulsion for determination of sodium and potassium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, Amsterdam, v. 74, n. 5, p. 1378-1384, Feb. 2008. doi:10.1016/j.talanta.2007.09.010.

73 CASTILHO, M. de S.; STRADIOTTO, N. R. Determination of potassium ions in biodiesel using a nickel(II) hexacyanoferrate-modified electrode. **Talanta**, Amsterdam, v. 74, n. 5, p. 1630-1634, Feb. 2008. doi:10.1016/j.talanta.2007.10.027.

74 BONDIOLI, P.; LANZANI, A.; FEDELI, E.; SALA, M.; VERONESE, S. Vegetable oil derivatives as diesel fuel substitutes. Analytical aspects. IV: Determination of biodiesel and diesel fuel in mixture. **Riv. Ital. Sostanze Gr.**, Milano, v. 71, n. 6, p. 287-289, 1994. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4201149>>. Acesso em: 5 maio 2009.

75 KNOTHE, G. Determining the blend level of mixtures of biodiesel with conventional diesel fuel by fiber-optic near-infrared spectroscopy and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 78, n. 10, p. 1025-1028, Oct. 2001. doi:10.1007/s11746-001-0382-0.

76 BÍROVÁ, A.; ŠVAJDLENKA, E.; CVENGROŠ, J.; DOSTÁLÍKOVÁ, V. Determination of the mass fraction of methyl esters in mixed fuels. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, Weinheim, v. 104, n. 5, p. 271-277, 2002. doi:10.1002/1438-9312(200205)104:5<271::AID-EJLT271>3.0.CO;2-B.

77 BONDIOLI, P.; BELLA, L. D. The evaluation of biodiesel quality in commercial blends with diesel fuel. **Riv. Ital. Sostanze Gr.**, Milano, v. 80, n. 3, p. 173-176, 2003. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=14872473>>. Acesso em: 5 maio 2009.

78 FOGLIA, T. A.; JONES, K. C.; PHILLIPS, J. G. Determination of biodiesel and triacylglycerols in diesel fuel by LC. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 62, n. 3/4, p. 115-119, Aug. 2005. doi:10.1365/s10337-005-0599-3.

79 KAMIŃSKI, M.; GILGENAST, E.; PRZYJAZNY, A.; ROMANIK, G. Procedure for and results of simultaneous determination of aromatic hydrocarbons and fatty acid methyl esters in diesel fuels by high performance liquid chromatography. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v. 1122, n. 1/2, p. 153-160, July 2006. doi:10.1016/j.chroma.2006.04.069.

80 OLIVEIRA, J. S.; MONTALVÃO, R.; DAHER, L.; SUAREZ, P. A. Z.; RUBIM, J. C. Determination of methyl ester contents in biodiesel blends by FTIR-ATR and FTNIR spectroscopies. **Talanta**, Amsterdam, v. 69, n. 5, p. 1278-1284, July 2006. doi:10.1016/j.talanta.2006.01.002.

81 PIMENTEL, M. F.; RIBEIRO, G. M. G. S.; CRUZ, R. S. da; STRAGEVITCH, L.; PACHECO FILHO, J. G. A.; TEIXEIRA, L. S. G. Determination of biodiesel content when blended with mineral diesel fuel using infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Microchem. J.**, New York, v. 82, n. 2, p. 201-206, Apr. 2006. doi:10.1016/j.microc.2006.01.019.

- 82 SASTRY, G. S. R.; MURTHY, A. S. R. K.; PRASAD, P. R.; BHUVANESWARI, K.; RAVI, P. V. Identification and determination of biodiesel in diesel. **Energy Sources Part A**, Philadelphia, v. 28, n. 14, p. 1337-1342, Oct. 2006. doi:10.1080/009083190933898.
- 83 DUBAN, J.; TURNER, R. On farm methods of biodiesel blend detection. In: AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL ENGINEERS ANNUAL INTERNATIONAL MEETING, 2006, Portland. **Proceedings...** St. Joseph: ASABE, 2006. Disponível em: <<http://asae.frymulti.com/azdez.asp?JID=5&AID=21560&CID=por2006&T=2>>. Acesso em: 5 maio 2009.
- 84 OLIVEIRA, F. C. C.; BRANDÃO, C. R. R.; RAMALHO, H. F.; COSTA, L. A. F. da; SUAREZ, P. A. Z.; RUBIM, J. C. Adulteration of diesel/biodiesel blends by vegetable oil as determined by fourier transform (FT) near infrared spectrometry and FT-Raman spectroscopy. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 587, n. 2, p. 194-199, Mar. 2007. doi:10.1016/j.aca.2007.01.045.
- 85 ZAWADZKI, A.; SHRESTHA, D. S.; HE, B. Biodiesel blend level detection using ultraviolet absorption spectra. **Trans. ASABE**, St. Joseph, v. 50, n. 4, p. 1349-1353, 2007. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=19082648>>. Acesso em: 5 maio 2009.
- 86 ALISKE, M. A.; ZAGONEL, G. F.; COSTA, B. J.; VEIGA, W.; SAUL, C. K. Measurement of biodiesel concentration in a diesel oil mixture. **Fuel**, London, v. 86, n. 10/11, p. 1461-1464, July/Aug. 2007. doi:10.1016/j.fuel.2006.11.008.
- 87 GUARIEIRO, L. L. N.; PINTO, A. C.; AGUIAR, P. F. de; RIBEIRO, N. M. Metodologia analítica para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel: diesel utilizando espectroscopia na região do infravermelho. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 421-426, 2008. doi:10.1590/S0100-40422008000200041.
- 88 CORGOZINHO, C. N. C.; PASA, V. M. D.; BARBEIRA, P. J. S. Determination of residual oil in diesel oil by spectrofluorimetric and chemometric analysis. **Talanta**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 479-484, July 2008. doi:10.1016/j.talanta.2008.03.003.
- 89 REDDY, C. M.; DEMELLO, J. A.; CARMICHAEL, C. A.; PEACOCK, E. E.; XU, L.; AREY, J. S. Determination of biodiesel blending percentages using natural abundance radiocarbon analysis: testing the accuracy of retail biodiesel blends. **Environ. Sci. Technol.**, Easton, v. 42, n. 7, p. 2476-2482, 2008. doi:10.1021/es071814j.
- 90 KNOTHE, G. Analyzing biodiesel: standards and other methods. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 83, n. 10, p. 823-833, Oct. 2006. doi:10.1007/s11746-006-5033-y.
- 91 MONTEIRO, M. R.; AMBROZIN, A. R. P.; LIAO, L. M.; FERREIRA, A. G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 593-605, Dec. 2008. doi:10.1016/j.talanta.2008.07.001.

- 92 FOGLIA, T. A.; JONES, K. C. Quantitation of neutral lipid mixtures using high performance liquid chromatography with light scattering detection. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, Philadelphia, v. 20, n. 12, p. 1829-1838, July 1997. doi:10.1080/10826079708005545.
- 93 FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; KWOLEK, W. F. Thin layer chromatography/flame ionization analysis of transesterified vegetable oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Berlin, v. 61, n. 7, p. 1215-1220, July 1984. doi:10.1007/BF02636255.
- 94 CVENGROŠ, J.; CVENGROŠOVÁ, Z. Quality control of rapeseed oil methyl esters by determination of acyl conversion. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 71, n. 12, p. 1349-1352, Dec. 1994. doi:10.1007/BF02541353.
- 95 HEIDEN, R. W. **Analytical methodologies for the determination of biodiesel ester purity – determination of total methyl esters**. Lancaster, 1996. Final Report. Disponível em: <http://www.biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/gen/19960227_gen-221.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2009.
- 96 POOLE, C. F. Recent advances in silylation of organic compounds for gas chromatography. In: BLAU, K.; KING, G. S. (Ed.). **Handbook of derivatives for chromatography**. London: Heyden, 1978. cap. 4, p. 152-200.
- 97 SPITZER, V. Screening analysis of unknowns seed oils. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, Weinheim, v. 101, n. 1, p. 2-19, 1999. doi:10.1002/(SICI)1521-4133(19991)101:1<2:AID-LIPI2>3.0.CO;2-H.
- 98 FREEDMAN, B.; KWOLEK, W. F.; PRYDE, E. H. Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capillary gas chromatography. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Berlin, v. 63, n. 10, p. 1370-1375, Oct. 1986. doi:10.1007/BF02679605.
- 99 CVENGROŠOVÁ, Z.; CVENGROŠ, J.; HRONEC, M. Rapeseed oil ethyl esters as alternative fuels and their quality control. **Pet. Coal**, Bratislava, v. 39, n. 3, p. 36-40, 1997.
- 100 CVENGROŠOVÁ, Z.; CVENGROŠ, J.; HRONEC, M. Determination of acyl conversion in vegetable oil ethyl esters. **Pet. Coal**, Bratislava, v. 40, n. 2, p. 97-99, 1998.
- 101 MARIANI, C.; BONDIOLI, P.; VENTURINI, S.; FEDELI, E. Vegetable oil derivatives as diesel fuel substitutes. Analytical aspects. I: determination of methyl esters, mono-, di- and triglycerides. **Riv. Ital. Sostanze Gr.**, Milano, v. 68, n. 10, p. 549-551, 1991. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=5575853>>. Acesso em: 5 maio 2009.
- 102 PLANK, C.; LORBEER, E. Quality control of vegetable oil methyl esters used as diesel fuel substitutes: quantitative determination of mono-, di-, and triglycerides by capillary GC. **J. High Resolut. Chromatogr.**, Weinheim, v. 15, n. 9, p. 609-612, 1992. doi:10.1002/jhrc.1240150910.

103 LI, C.; TANG, Z.; YANG, H. Determination of fatty acid methyl esters and glycerides in biodiesel samples by GC. **Fenxi Ceshi Xuebao**, Guangzhou, v. 24, n. 5, p. 66-68, 2005.

104 WAWRZYNIAK, R.; WASIAK, W.; FRACKOWIAK, M. Determination of methyl esters in diesel oils by gas chromatography - validation of the method. **Chem. Pap.**, Bratislava, v. 59, n. 6b, p. 449-452, 2005. Disponível em: <<http://www.chempap.org/?id=7&paper=1>>. Acesso em: 13 maio 2009.

105 MITTELBAACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils. V: gas chromatographic determination of free glycerol in transesterified vegetable oils. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 37, n. 11/12, p. 623-626, Dec. 1993. doi:10.1007/BF02274113.

106 BONDIOLI, P.; MARIANI, C.; LANZANI, A.; FEDELI, E.; VERONESE, S. Vegetable oil derivatives as diesel fuel substitutes. Analytical aspects. Note 2: determination of free glycerol. **Riv. Ital. Sostanze Gr.**, Milano, v. 69, n. 1, p. 7-9, 1992. Disponível em: <http://www.biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/gen/19920101_gen341.pdf>. Acesso em: 5 maio 2009.

107 LI, C.; YANG, H.; WANG, L.; TIAN, S. Application of gas chromatography in biodiesel processing. **Sepu**, Beijing, v. 24, n. 5, p. 524-528, 2006.

108 BONDIOLI, P.; MARIANI, C.; FEDELI, E.; GOMEZ, A. M.; VERONESE, S. Vegetable oil derivatives as diesel fuel substitutes. Analytical aspects. Note 3: determination of methanol. **Riv. Ital. Sostanze Gr.**, Milano, v. 69, n. 9, p. 467-469, 1992. Disponível em: <http://www.biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/gen/20020901_gen-340.pdf>. Acesso em: 5 maio 2009.

109 PLANK, C.; LORBEER, E. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v. 697, p. 461-468, Apr. 1995. doi:10.1016/0021-9673(94)00867-9.

110 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **D6751-03a**: standard specification for biodiesel fuel (B100) blend stock for distillate fuels. Philadelphia, 2005.

111 PLANK, C.; LORBEER, E. Analysis of free and esterified sterols in vegetable oil methyl esters by capillary GC. **J. High. Resolut. Chromatogr.**, Weinheim, v. 16, n. 8, p. 483-487, 1993. doi:10.1002/jhrc.1240160808.

112 PLANK, C.; LORBEER, E. Minor components in vegetable oil methyl esters I: sterols in rape seed oil methyl ester. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, Weinheim, v. 96, n. 10, p. 379-386, 1994. doi:10.1002/lipi.19940961004.

- 113 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios da análise instrumental. In: _____. **Cromatografia líquida de alta eficiência**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. cap. 28, p. 641-686.
- 114 HOLČAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER, J.; PROKEŠ, B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v. 858, n. 1, p. 13-31, Oct. 1999. doi:10.1016/S0021-9673(99)00790-6.
- 115 TRATHNIGG, B.; MITTELBAACH, M. Analysis of triglyceride methanolysis mixtures using isocratic HPLC with density detection. **J. Liq. Chrom.**, Philadelphia, v. 13, n. 1, p. 95-105, Jan. 1990. doi:10.1080/01483919008051790.
- 116 HOLČAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER, J. Analysis of acylglycerols and methyl esters of fatty acids in vegetable oils and in biodiesel. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, Boca Raton, v. 31, n. 1, p. 53-56, Jan. 2001. doi:10.1080/20014091076686.
- 117 KOMERS, K.; STLOUKAL, R.; MACHEK, J.; SKOPAL, F. Biodiesel from rapeseed oil, methanol and KOH. 3. Analysis of composition of actual mixture. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, Weinheim, v. 103, n. 6, p. 363-371, 2001. doi:10.1002/1438-9312(200106)103:6<363::AID-EJLT363>3.0.CO;2-3.
- 118 DI NICOLA, G.; PACETTI, M.; POLONARA, F.; SANTORI, G.; STRYJEK, R. Development and optimization of a method for analyzing biodiesel mixtures with non-aqueous reversed phase liquid chromatography. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v. 1190, n. 1/2, p. 120-126, May 2008. doi:10.1016/j.chroma.2008.02.085.
- 119 LECHNER, M.; BAUER-PLANCK, C.; LORBEER, E. Determination of acylglycerols in vegetable oil methyl esters by online normal phase LC-GC. **J. High. Resolut. Chromatogr.**, Weinheim, v. 20, n. 11, p. 581-585, 1997. doi:10.1002/jhrc.1240201103.
- 120 PLANK, C.; LORBEER, E. On-line liquid chromatography - gas chromatography for the analysis of free and esterified sterols in vegetable oil methyl esters used as diesel fuel substitutes. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v. 683, n. 1, p. 95-104, Oct. 1994. doi:10.1016/S0021-9673(94)89106-0.
- 121 FILLIÈRES, R.; BENJELLOUN-MLAYAH, B.; DELMAS, M. Ethanolysis of rapeseed oil: quantitation of ethyl esters, mono-, di-, and triglycerides and glycerol by high-performance size-exclusion chromatography. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 72, n. 4, p. 427-432, Apr. 1995. doi:10.1007/BF02636083.
- 122 DARNOKO, D.; CHERYAN, M.; PERKINS, E. G. Analysis of vegetable oil transesterification products by gel permeation chromatography. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, Philadelphia, v. 23, n. 15, p. 2327-2335, Sept. 2000. doi:10.1081/JLC-100100491.

- 123 DUBÉ, M. A.; ZHENG, S.; McLEAN, D. D.; KATES, M. A comparison of attenuated total reflectance-FTIR spectroscopy and GPC for monitoring biodiesel production. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 81, n. 6, p. 599-603, June 2004. doi:10.1007/s11746-006-0948-x.
- 124 ARZAMENDI, G.; ARGUIÑARENA, E.; CAMPO, I.; GANDÍA, L. M. Monitoring of biodiesel production: simultaneous analysis of the transesterification products using size-exclusion chromatography. **Chem. Eng. J. (Amsterdam, Neth.)**, Amsterdam, v. 122, n. 1/2, p. 31-40, Sept. 2006. doi:10.1016/j.cej.2006.05.009.
- 125 HÁJEK, M.; SKOPAL, F.; MACHEK, J. Determination of free glycerol in biodiesel. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, Weinheim, v. 108, n. 8, p. 666-669, 2006. doi:10.1002/ejlt.200600004.
- 126 LOZANO, P.; CHIRAT, N.; GRAILLE, J.; PIOCH, D. Measurement of free glycerol in biofuels. **Fresenius J. Anal. Chem.**, Berlin, v. 354, n. 3, p. 319-322, Jan. 1996. doi:10.1007/s0021663540319.
- 127 PARASCHIVESCU, M. C.; ALLEY, E. G.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; ARMBRUST, K. Determination of methanol in biodiesel by headspace solid phase microextraction. **Bioresour. Technol.**, New York, v. 99, n. 13, p. 5901-5905, Sept. 2008. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.088.
- 128 GELBARD, G.; BRÈS, O.; VARGAS, R. M.; VIELFAURE, F.; SCHUCHARDT, U. F. ¹H nuclear magnetic resonance determination of the yield of the transesterification of rapeseed oil with methanol. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 72, n. 10, p. 1239-1241, Oct. 1995. doi:10.1007/BF02540998.
- 129 DIMMIG, T.; RADIG, W.; KNOLL, C.; DITTMAR, T. ¹³C-NMR spectroscopic determination of the conversion and reaction kinetics of transesterification of triglycerides to methylesters. **Chem. Tech. (Leipzig)**, Leipzig, v. 51, n. 6, p. 326-329, 1999.
- 130 COSTA NETO, P. R.; CARO, M. S. B.; MAZZUCO, L. M.; NASCIMENTO, M. G. Quantification of soybean oil ethanolysis with ¹H NMR. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 81, n. 12, p. 1111-1114, Dec. 2004. doi:10.1007/s11746-004-1026-0.
- 131 MORGENSTERN, M.; CLINE, J.; MEYER, S.; CATALDO, S. Determination of the kinetics of biodiesel production using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR). **Energy Fuels**, Washington, v. 20, n. 4, p. 1350-1353, 2006. doi:10.1021/ef0503764.
- 132 KNOTHE, G. Rapid monitoring of transesterification and assessing biodiesel fuel quality by near-infrared spectroscopy using a fiber-optic probe. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 76, n. 7, p. 795-800, July 1999. doi:10.1007/s11746-999-0068-5.

- 133 FELIZARDO, P.; BAPTISTA, P.; MENEZES, J. C.; CORREIA, M. J. N. Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting methanol and water content in biodiesel. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 595, n. 1/2, p. 107-113, July 2007. doi:10.1016/j.aca.2007.02.050.
- 134 FELIZARDO, P.; BAPTISTA, P.; UVA, M. S.; MENEZES, J. C.; CORREIA, M. J. N. Monitoring biodiesel fuel quality by near infrared spectroscopy. **J. Near Infrared Spectrosc.**, Chichester, v. 15, n. 2, p. 97-105, 2007. doi:10.1255/jnirs.714.
- 135 BAPTISTA, P.; FELIZARDO, P.; MENEZES, J. C.; CORREIA, M. J. N. Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting the methyl esters content in biodiesel. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 607, n. 2, p. 153-159, Jan. 2008. doi:10.1016/j.aca.2007.11.044.
- 136 ZAGONEL, G. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; RAMOS, L. P. Multivariate monitoring of soybean oil ethanolysis by FTIR. **Talanta**, Amsterdam, v. 63, n. 4, p. 1021-1025, July 2004. doi:10.1016/j.talanta.2004.01.008.
- 137 SIATIS, N. G.; KIMBARIS, A. C.; PAPPAS, C. S.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M. G. Improvement of biodiesel production based on the application of ultrasound: monitoring of the procedure by FTIR spectroscopy. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 83, n. 1, p. 53-57, Jan. 2006. doi:10.1007/s11746-006-1175-1.
- 138 BARONE, J. R. Properties of biodegradable feather keratin polymers. In: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY NATIONAL MEETING, 233., 2007, Chicago. **Proceedings...** Washington, DC: ACS, 2007.
- 139 GHESTI, G. F.; MACEDO, J. L. de; BRAGA, V. S.; SOUZA, A. T. C. P. de; PARENTE, V. C. I.; FIGUERÊDO, E. S.; RESCK, I. S.; DIAS, J. A.; DIAS, S. C. L. Application of raman spectroscopy to monitor and quantify ethyl esters in soybean oil transesterification. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 83, n. 7, p. 597-601, July 2006. doi:10.1007/s11746-006-1244-5.
- 140 GHESTI, G. F.; MACEDO, J. L. de; RESCK, I. S.; DIAS, J. A.; DIAS, S. C. L. FT-Raman spectroscopy quantification of biodiesel in a progressive soybean oil transesterification reaction and its correlation with ¹H NMR spectroscopy methods. **Energy Fuels**, Washington, v. 21, n. 5, p. 2475-2480, 2007. doi:10.1021/ef060657r.
- 141 LOUZEIRO, H. C.; SILVA, F. C.; MOUZINHO, A. M. C.; NASCIMENTO, A. A.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M. Determinação do teor de glicerina livre em biodiesel por espectrofotometria do UV-visível. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1., 2006, Brasília. **Anais eletrônicos...** Brasília: Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2006. p. 286-290. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congressso2006/Caracterizacao/DeterminacaoTeor12.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2009.

- 142 FANG, F.; ZENG, H. Determination of free methanol in biodiesel oil. **Jingxi Huagong Zhongjianti**, Beijing, v. 35, n. 1, p. 66-67, 2005.
- 143 ARAUJO, A. R. T. S.; SARAIVA, M. L. M. F. S.; LIMA, J. L. F. C.; KORN, M. G. A. Flow methodology for methanol determination in biodiesel exploiting membrane-based extraction. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 613, n. 2, p. 177-183, Apr. 2008. doi:10.1016/j.aca.2008.03.005.
- 144 FILIPPIS, P. de; GIAVARINI, C.; SCARSELLA, M.; SORRENTINO, M. Transesterification processes for vegetable oils: a simple control method of methyl ester content. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 72, n. 11, p. 1399-1404, Nov. 1995. doi:10.1007/BF02546218.
- 145 ELLIS, N.; GUAN, F.; CHEN, T.; POON, C. Monitoring biodiesel production (transesterification) using in situ viscometer. **Chem. Eng. J. (Amsterdam, Neth.)**, Amsterdam, v. 138, n. 1/3, p. 200-206, May 2008. doi:10.1016/j.cej.2007.06.034.
- 146 GONÇALVES FILHO, L. C.; MICKE, G. A. Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v. 1154, n. 1/2, p. 477-480, June 2007. doi:10.1016/j.chroma.2007.04.063.
- 147 FAAS, B.; SCHLINK, R. Determination of water in biodiesel. **LaborPraxis**, Würzburg v. 31, n. 1/2, p. 34-36, 2007.
- 148 TODD, M. S.; PETERS, T.; LECAPTAIN, D. J. Direct sampling mass spectrometry of water in biodiesel. In: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY NATIONAL MEETING, 233., 2007, Chicago. **Proceedings...** Washington: ACS, 2007.
- 149 CATHARINO, R. R.; MILAGRE, H. M. S.; SARAIVA, S. A.; GARCIA, C. M.; SCHUCHARDT, U.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, R.; PEREIRA, R. C. L.; GUIMARÃES, M. J. R.; SÁ, G. F. de; CAIXEIRO, J. M. R.; SOUZA, V. de. Biodiesel typification and quality control by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Energy Fuels**, Washington, v. 21, n. 6, p. 3698-3701, 2007. doi:10.1021/ef7003078.
- 150 INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **A guide to IUPAC nomenclature of organic compounds**: recommendations 1993. Disponível em: <<http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/>>. Acesso em: 28 abr. 2009.
- 151 MORRISON, L. R. Glycerol. In: KIRK, R. E.; OTHMER, D. F. **Kirk-Othmer**: encyclopedia of chemical technology. New York: Wiley, 2000. doi:10.1002/0471238961.0712250313151818.a01.
- 152 PHYSICAL constants of organic compounds. In: LIDE, D. R.; TAYLOR, F. (Ed.). **CRC handbook of chemistry and physics**. 89th ed. Boca Raton, 2009. Disponível em: <<http://www.hbcnpnetbase.com/>>. Acesso em: 28 abr. 2009.

153 GUIMARÃES, J. L.; SATYANARAYANA, K. G.; WYPYCH, R. L. P. Preparo de compósitos biodegradáveis a partir de fibras de bananeira plastificadas com amido e glicerina bruta derivada da alcoólise de óleos vegetais. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, 1., 2006, Brasília. **Anais...** Brasília: Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, 2006. p. 28-33. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/Co-Produtos/PreparoCompositos6.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2009.

154 WOOLLATT, E. **The manufacture of soaps, other detergents and glycerin.** New York: John Wiley & Sons, 1985. p. 296-357.

155 SMYTH, H. F.; SEATON, J.; FISCHER, L. The single-dose toxicity of some glycols and derivatives. **J. Ind. Hyg. Toxicol.**, Baltimore, v. 23, p. 259-268, 1941.

156 ANDERSON, R. C.; HARRIS, P. N.; CHEN, K. K. Toxicological studies on synthetic glycerin. **J. Am. Pharm. Assoc.**, Easton, v. 39, n. 10, p. 583-585, 1950.

157 JOHNSON, V.; CARLSON, A. J. Studies on the physiological action of glycerol on the animal organism. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 103, p. 517-534, 1933.

158 HINE, C. H.; ANDERSON, H. H.; MOON, H. D.; DUNLAP, M. K.; MORSE, M. S. Comparative toxicity of synthetic and natural glycerin. **Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.**, Chicago, v. 7, n. 4, p. 282-291, 1953.

159 DEICHMANN, W. Glycerol-behavior in the animal organism - a review of the literature. **AIHA**, Chicago, v. 1, n. 4, p. 60-67, Oct. 1940.

160 SLOVITER, H. A. Effects of the intravenous administration of glycerol solutions to animals and man. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 37, n. 5, p. 619-626, May 1958. doi:10.1172/JCI103644.

161 KISSINGER, P. T. Laboratory techniques in electroanalytical chemistry. In: KISSINGER, P. T.; HELNEMAN, W. R. **Monographs in electroanalytical chemistry and electrochemistry.** New York: Marcel Dekker, 1984. p. 631-632.

162 ADAMS, R. N. **Electrochemistry at solid electrodes.** New York: Marcel Dekker, 1969. 402 p.

163 GILMAN, S. Anodic film on platinum electrodes. In: BARD, A. J. **Electroanalytical chemistry.** New York: Marcel Dekker, 1967. v. 2, p. 111-192.

164 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. Effect of adsorption of electroinactive species. In: _____. **Electrochemical methods: fundamentals and applications.** 2nd ed. New York: John Wiley, 2001. cap. 13, p. 569-571.

- 165 HUGHES, S.; MESCHI, P. L.; JOHNSON, D. C. Amperometric detection of simple alcohols in aqueous solutions by application of a triple-pulse potential waveform at platinum electrodes. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 132, p. 1-10, Dec. 1981. doi:10.1016/S0003-2670(01)93871-1.
- 166 LACOURSE, W. R.; JOHNSON, D. C.; REY, M. A.; SLINGSBY, R. W. Pulsed amperometric detection of aliphatic alcohols in liquid chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 63, n. 2, p. 134-139, Jan. 1991. doi:10.1021/ac00002a009.
- 167 CHENG, J.; JANDIK, P.; LIU, X.; POHL, C. Pulsed amperometric detection waveform with disposable thin-film platinum working electrodes in high performance liquid chromatography. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 608, n. 2, p. 117-124, Oct. 2007. doi:10.1016/j.jelechem.2007.05.015.
- 168 VASIL'EV, Y. B.; BAGOTSKII, V. S. Some problems of electrooxidation of organic substances. **Toplivn. Elementy**, Moscow, p. 108-136, 1964.
- 169 ROQUET, L.; BELGSIR, E. M.; LÉGER, J-M.; LAMY, C. Kinetics and mechanisms of the electrocatalytic oxidation of glycerol as investigated by chromatographic analysis of the reaction products: potential and pH effects. **Electrochim. Acta**, Oxford, v. 39, n. 16, p. 2387-2394, Nov. 1994. doi:10.1016/0013-4686(94)E0190-Y.
- 170 KAHYAOGU, A.; BEDEN, B.; LAMY, C. Oxydation electrocatalitique du glycerol sur electrodes d'or et de platine en milieu aqueux. **Electrochim. Acta**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1489-1492, Oct. 1984. doi:10.1016/0013-4686(84)87033-4.
- 171 TREMILIOSI FILHO, G.; GONZALEZ, E. R.; MOTHEO, A. J.; BELGSIR, E. M.; LÉGER, J-M.; LAMY, C. Electro-oxidation of ethanol on gold: analysis of the reaction products and mechanism. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 444, n. 1, p. 31-39, Mar. 1998. doi:10.1016/S0022-0728(97)00536-6.
- 172 ROY, C. B.; NANDI, D. K.; RAO, K. V. Electrocatalytic oxidation of methanol, ethanol, isopropanol, glycol and glycerol on platinum-gold electrodes. **Indian J. Chem., Sect. A: Inorg., Bio-inorg., Phys., Theor. Anal. Chem.**, New Delhi, v. 24A, n. 9, p. 742-744, 1985.
- 173 VITT, J. E.; LAREW, L. A.; JOHNSON, D. C. The importance of adsorption in anodic surface-catalyzed oxygen-transfer reactions at gold electrodes. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 2, n. 1, p. 21-30, 1990. doi:10.1002/elan.1140020106.
- 174 SHIGANG, S.; DONGFANG, Y.; ZHAOWU, T. Adsorption and oxidation of glycerol on platinum electrodes investigated by *in situ* FTIR spectroscopy. **Acta Chim. Sinica**, Beijing, v. 50, n. 6, p. 533-538, June 1992.
- 175 TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. **Eletroquímica: princípios e aplicações**. São Paulo: Ed. USP, 1998. p. 127-140.

176 BURKE, L. D.; ROCHE, M. B. C. Enhanced oxide growth at a platinum electrode in acid under potential cycling conditions. **J. Electroanal. Chem.**, Lausanne, v. 137, n. 1, p. 175-181, July 1982. doi:10.1016/0022-0728(82)85078-X.

177 BURKE, L. D.; BORODZINSKI, J. J.; O'DWYER, K. J. Multilayer oxide growth on platinum under potential cycling conditions. I. Sulfuric acid solution. **Electrochim. Acta**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 967-973, June 1990. doi:10.1016/0013-4686(90)90029-Y.

178 BURKE, L. D.; O'DWYER, K. J. Multilayer oxide growth on platinum under potential cycling conditions - II. Perchloric acid and sodium hydroxide solutions. **Electrochim. Acta**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 43-50, Jan. 1992. doi:10.1016/0013-4686(92)80010-J.

179 HU, C-C.; LIU, K-Y. Voltammetric investigation of platinum oxides. I. Effects of ageing on their formation/reduction behavior as well as catalytic activities for methanol oxidation. **Electrochim. Acta**, Oxford, v. 44, n. 16, p. 2727-2738, Apr. 1999. doi:10.1016/S0013-4686(98)00400-9.

180 HU, C-C.; LIU, K-Y. Voltammetric investigation of platinum oxides II. Effect of hydration on their reduction behavior. **Electrochim. Acta**, Oxford, v. 45, n. 19, p. 3063-3068, June 2000. doi:10.1016/S0013-4686(00)00399-6.

181 NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of stationary electrode polarography - single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible and kinetic system. **Anal. Chem.**, Washington, v. 36, n. 4, p. 706-723, Apr. 1964. doi:10.1021/ac60210a007.

182 JAMES, S. D. Multilayer oxide films on anodized platinum. **J. Electrochem. Soc.**, New York, v. 116, n. 12, p. 1681-1688, 1969. doi:10.1149/1.2411659.

183 BACAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S. **Química analítica quantitativa elementar**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 308 p.

ANEXOS

ANEXO A – Métodos ABNT presentes no Regulamento Técnico ANP nº 1/2008 como parte integrante da Resolução nº 7 de 19 de março de 2008

MÉTODO	TÍTULO
NBR 6294	Óleos lubrificantes e aditivos - Determinação de cinza sulfatada
NBR 7148	Petróleo e produtos de petróleo - Determinação da massa específica, densidade relativa e °API - Método do densímetro
NBR 10441	Produtos de petróleo - Líquidos transparentes e opacos - Determinação da viscosidade cinemática e cálculo da viscosidade dinâmica
NBR 14065	Destilados de petróleo e óleos viscosos - Determinação da massa específica e da densidade relativa pelo densímetro digital.
NBR 14359	Produtos de petróleo - Determinação da corrosividade - método da lâmina de cobre
NBR 14448	Produtos de petróleo - Determinação do índice de acidez pelo método de titulação potenciométrica
NBR 14598	Produtos de petróleo - Determinação do Ponto de Fulgor pelo aparelho de vaso fechado Pensky-Martens
NBR 14747	Óleo Diesel - Determinação do ponto de entupimento de filtro a frio
NBR 15341	Biodiesel - Determinação de glicerina livre em biodiesel de mamona por cromatografia em fase gasosa
NBR 15342	Biodiesel - Determinação de monoglicerídeos, diglicerídeos e ésteres totais em biodiesel de mamona por cromatografia em fase gasosa
NBR 15343	Biodiesel - Determinação da concentração de metanol e/ou etanol por cromatografia gasosa
NBR 15344	Biodiesel - Determinação de glicerina total e do teor de triglicerídeos em biodiesel de mamona
NBR 15553	Produtos derivados de óleos e gorduras - Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos - Determinação dos teores de cálcio, magnésio, sódio, fósforo e potássio por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICPOES)
NBR 15554	Produtos derivados de óleos e gorduras - Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos - Determinação do teor de sódio por espectrometria de absorção atômica
NBR 15555	Produtos derivados de óleos e gorduras - Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos - Determinação do teor de potássio por espectrometria de absorção atômica
NBR 15556	Produtos derivados de óleos e gorduras - Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos - Determinação de sódio, potássio, magnésio e cálcio por espectrometria de absorção atômica

Fonte: Diário Oficial da União.

ANEXO B – Métodos ASTM presentes no Regulamento Técnico ANP nº 1/2008 como parte integrante da Resolução nº 7 de 19 de março de 2008

MÉTODO	TÍTULO
ASTM D93	Flash Point by Pensky-Martens Closed Cup Tester
ASTM D130	Detection of Copper Corrosion from Petroleum Products by the Copper Strip Tarnish Test
ASTM D445	Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and the Calculation of Dynamic Viscosity)
ASTM D613	Cetane Number of Diesel Fuel Oil
ASTM D664	Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration
ASTM D874	Sulfated Ash from Lubricating Oils and Additives
ASTM D1298	Density, Relative Density (Specific Gravity) or API Gravity of Crude Petroleum and Liquid Petroleum Products by Hydrometer
ASTM D4052	Density and Relative Density of Liquids by Digital Density Meter
ASTM D4530	Determination of Carbon Residue (Micro Method)
ASTM D4951	Determination of Additive Elements in Lubricating Oils by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry
ASTM D5453	Total Sulfur in Light Hydrocarbons, Motor Fuels and Oils by Ultraviolet Fluorescence
ASTM D6304	Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils, and Additives by Coulometric Karl Fisher Titration
ASTM D6371	Cold Filter Plugging Point of Diesel and Heating Fuels
ASTM D6584	Determination of Free and Total Glycerine in Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography
ASTM D6890	Determination of Ignition Delay and Derived Cetane Number (DCN) of Diesel Fuel Oils by Combustion in a Constant Volume Chamber

Fonte: Diário Oficial da União.

ANEXO C – Métodos EN/ISO presentes no Regulamento Técnico ANP nº 1/2008 como parte integrante da Resolução nº 7 de 19 de março de 2008

MÉTODO	TÍTULO
EN 116	Determination of Cold Filter Plugging Point
EN ISO 2160	Petroleum Products - Corrosiveness to copper - Copper strip test
EN ISO 3104	Petroleum Products - Transparent and opaque liquids - Determination of kinematic viscosity and calculation of dynamic viscosity
EN ISO 3675	Crude petroleum and liquid petroleum products - Laboratory determination of density - Hydrometer method
EN ISO 3679	Determination of flash point - Rapid equilibrium closed cup method
EN ISO 3987	Petroleum Products - Lubricating oils and additives - Determination of sulfated ash
EN ISO 5165	Diesel fuels - Determination of the ignition quality of diesel fuels - Cetane engine
EN 10370	Petroleum Products - Determination of carbon residue - Micro Method
EN ISO 12185	Crude petroleum and liquid petroleum products. Oscillating U-tube
EN ISO 12662	Liquid Petroleum Products - Determination of contamination in middle distillates
EN ISO 12937	Petroleum Products - Determination of water - Coulometric Karl Fischer Titration
EN 14103	Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents
EN 14104	Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of acid value
EN 14105	Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of free and total glycerol and mono-, di- and triglyceride content - (Reference Method)
EN 14106	Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of free glycerol content
EN 14107	Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of phosphorous content by inductively coupled plasma (ICP) emission spectrometry
EN 14108	Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of sodium content by atomic absorption spectrometry
EN 14109	Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of potassium content by atomic absorption spectrometry
EN 14110	Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of methanol content
EN 14111	Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of iodine value
EN 14112	Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test)
EN 14538	Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of Ca, K, Mg and Na content by optical emission spectral analysis with inductively coupled plasma (ICP-OES)
EN ISO 20846	Petroleum Products - Determination of low sulfur content - Ultraviolet fluorescence method
EN ISO 20884	Petroleum Products - Determination of sulfur content of automotive fuels - Wavelength-dispersive X-ray fluorescence spectrometry

Fonte: Diário Oficial da União.

ANEXO D – Especificação do biodiesel consoante Regulamento Técnico ANP nº 1/2008 como parte integrante da Resolução nº 7 de 19 de março de 2008

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m ³	850-900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 - EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0-6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de Água, máx. (2)	mg/kg	500	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	EN ISO 12662
Ponto de fulgor, mín. (3)	°C	100,0	14598 -	93 -	- EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15342 (4) (5)	-	EN 14103
Resíduo de carbono (6)	% massa	0,050	-	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	50	- -	5453	- EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número de Cetano (7)	-	Anotar	-	613 6890 (8)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19 (9)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448 -	664 -	- EN 14104 (10)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 (5) -	6584 (10) -	- EN 14105 (10) EN 14106 (10)
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344 (5) -	6584 (10) -	- EN 14105 (10)
Mono, di, triacilglicerol (7)	% massa	Anotar	15342 (5) 15344 (5)	6584 (10)	- - EN 14105 (10)
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de Iodo (7)	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.(2)	h	6	-	-	EN 14112 (10)

Fonte: Diário Oficial da União.