



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS E CROMATOGRÁFICAS NA  
ANÁLISE DIRETA DE ANTIOXIDANTES EM BIODIESEL DILUÍDO  
EM METANOL E ETANOL OU COMO MICROEMULSÃO LIVRE DE  
SURFACTANTE**

**TESE DE DOUTORADO**

**MARCELLA CASAGRANDE**

**Porto Alegre**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS E CROMATOGRÁFICAS NA  
ANÁLISE DIRETA DE ANTIOXIDANTES EM BIODIESEL DILUÍDO  
EM METANOL E ETANOL OU COMO MICROEMULSÃO LIVRE DE  
SURFACTANTE**

**MARCELLA CASAGRANDE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Clarisse Maria Sartori Piatnicki

**Co-Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jacqueline Argüello da Silva

**Porto Alegre  
2017**

## DECLARAÇÃO DE AUTORIA

A presente tese foi realizada inteiramente pela autora, exceto as colaborações, as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre março de 2013 e março de 2017, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Professora Doutora Clarisse Maria Sartori Piatnicki, e no período entre agosto de 2014 e julho de 2015 na *School of Chemistry* da *Monash University*, em Melbourne - Victoria/Austrália, sob orientação do Professor Doutor Philip John Marriott.

---

Marcella Casagrande  
(Doutoranda)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Clarisse Maria Sartori Piatnicki  
(Orientadora)

A presente tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Química e aprovada em sua versão final pela Orientadora e pela Comissão Examinadora.

**Comissão Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Rosane Barboza Mendonça

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Carmo Ruaro Peralba

---

Prof Dr Silvio Luis Pereira Dias

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Yara Patrícia da Silva

*À minha família, pelo apoio nesta jornada.*

## AGRADECIMENTOS

Foram tantas as pessoas que cruzaram meu caminho nesses quatro anos de doutorado, tantos gestos de amizade e carinho, tantos agradecimentos!

Aos meus pais e irmão, que mesmo à distância sempre me incentivaram e me apoiaram nessa etapa. Pelo exemplo de vida que me passaram, pelos conselhos e orientações, pelo amor, pela confiança que em mim depositaram: muito obrigada! Faltam palavras nesse momento para expressar meu amor e gratidão a vocês!

À minha família, pelo incentivo, compreensão e amor.

Ao meu companheiro de todas as horas, Stéfano, sempre me estimulando e apoiando, mesmo nos momentos difíceis; pelo amor e presença durante toda essa jornada, infinitamente obrigada! À sua maravilhosa família, que me acolheu de braços abertos e para quem tenho dívida infinita, meus agradecimentos aqui são poucos para todos vocês.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Clarisse, que sempre foi mais que uma orientadora acadêmica. Por ter me acolhido desde minha chegada a Porto Alegre, por todos os ensinamentos, apoio, orientações científicas e incentivo durante todos esses anos, tens meu eterno agradecimento e admiração!

Ao Prof Philip Marriott, por abrir as portas de seu laboratório, pela orientação, por seu grande amor por GC que acaba sendo transmitido até mesmo para quem nunca teve contato com a técnica. Por todo apoio, ensinamentos e amizade dados pelos colegas de laboratório, Chadin Kulsing, Jalal Althakafy, Yada Nolvachai, Yong Wong, Siti Umairah, Sung Tong Chin, Sabrina Kroger, Renee Webster, Annie Xu Zeng, Sunny Leesun Kim e Zhi Hong Tay.

Às colegas eletroquímicas sempre presentes, muito mais que colegas, amigas que a vida me presenteou! Andrea Hoffmann, Yara Patrícia, Lívia Schaumlöffel e Rafaela Rodrigues, por toda a ajuda nos experimentos, nas análises de resultados, pela amizade e companheirismo: meu grande obrigada a todas.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química, pelo apoio prestado durante esses anos.

Às agências de fomento CAPES e CNPq, por viabilizarem a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas, que por falha de minha memória nesse momento, não foram aqui incluídos.

A todos, **muito obrigada!**

*É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.*

Theodore Roosevelt

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xviii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>xix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xxi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xxii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 Objetivos.....</b>	<b>24</b>
1.1.1 Objetivo Geral .....	24
1.1.1 Objetivos Específicos .....	25
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Biodiesel.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Estabilidade Oxidativa do Biodiesel .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3 Antioxidantes Fenólicos Sintéticos.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4 Microemulsões.....</b>	<b>33</b>
2.4.1 Classificação das Microemulsões.....	33
2.4.2 Técnicas para Caracterização das Microemulsões .....	35
2.4.3 Microemulsões Livres de Surfactante.....	35
2.4.3.1 Formação de Microemulsões Livres de Surfactante.....	36
<b>2.5 Técnicas Cromatográficas.....</b>	<b>38</b>
2.5.1 Cromatografia em Fase Gasosa.....	39
2.5.2 Cromatografia em Fase Líquida: HPLC e UHPLC .....	40
<b>2.6 Técnicas Eletroanalíticas.....</b>	<b>41</b>
2.6.1 Ultramicroeletrodos .....	41
2.6.2 Microeletrodos de Fibra de Carbono .....	42
2.6.3 Técnicas Eletroquímicas de Análise .....	44
2.6.3.1 Voltametria de Pulso Diferencial.....	44
2.6.3.2 Voltametria de Onda Quadrada .....	45
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Materiais.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2 Metodologia .....</b>	<b>48</b>
3.2.1 Preparo de Amostras e Soluções-Padrão .....	48
3.2.1.1 Voltametria de Pulso Diferencial em ume de Pt.....	48
3.2.1.2 Caracterização da SFME .....	49
3.2.1.3 Voltametrias de Pulso Diferencial e de Onda Quadrada em CFM .....	49
3.2.1.4 Voltametria de Pulso Diferencial em ume de Au .....	50
3.2.2 Análises Cromatográficas .....	51
3.2.2.1 Análise por GC/qMS.....	51
3.2.2.2 Análise por HPLC-UV.....	51
3.2.2.3 Análise por UHPLC-ESI-Orbitrap/MS .....	52
3.2.3 Estudo da Estabilidade do Biodiesel.....	53

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Estudos Eletroquímicos.....</b>	<b>54</b>
4.1.1 Determinação e Quantificação Simultânea de TBHQ e PG em Meio Etanólico Empregando uma de Pt como Eletrodo de Trabalho.....	54
4.1.1.1 Comportamento do Meio Solvente .....	54
4.1.1.2 Curvas de Calibração para TBHQ e PG.....	55
4.1.1.3 Análise da Interferência Mútua entre TBHQ e PG.....	59
4.1.1.4 Quantificação Simultânea de TBHQ e PG .....	62
4.1.1.5 Experimentos de Recuperação.....	64
4.1.2 Formação e Caracterização de SFME A/O de Biodiesel.....	66
4.1.2.1 Coeficiente de Difusão do Ferroceno em SFME A/O de Biodiesel .....	72
4.1.3 Quantificação Simultânea de TBHQ e BHT em SFME A/O de Biodiesel Empregando CFM como Eletrodo de Trabalho .....	74
4.1.4 Quantificação Simultânea de TBHQ e BHT em SFME A/O de Biodiesel Empregando uma de Au como Eletrodo de Trabalho .....	80
4.1.4.1 Comportamento do Meio Solvente .....	80
4.1.4.2 Curvas de Calibração para TBHQ e BHT .....	82
4.1.4.3 Análise da Interferência Mútua entre TBHQ e BHT .....	86
4.1.4.4 Quantificação Simultânea de TBHQ e BHT .....	90
4.1.4.5 Experimentos de Recuperação.....	92
<b>4.2 Análise por Cromatografia .....</b>	<b>94</b>
4.2.1 Análise por GC/qMS .....	94
4.2.1.1 Curvas de Calibração e Limites de Detecção .....	97
4.2.2 Análise por HPLC-UV.....	100
4.2.2.1 Seleção de Coluna e Comprimento de Onda .....	100
4.2.2.2 Curvas de Calibração e Limites de Detecção .....	102
4.2.3 Análise por UHPLC-ESI-Orbitrap/MS.....	105
4.2.4 Avaliação da Estabilidade do Biodiesel.....	108
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>112</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>114</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema geral da reação de transesterificação, em que: R - cadeia carbônica dos ácidos graxos e R' - cadeia carbônica do álcool reagente .....27
- Figura 2.** Esquema do ciclo do CO<sub>2</sub> para biodiesel e combustíveis fósseis (adaptado).....28
- Figura 3.** Percentual das matérias-primas empregadas na produção de biodiesel em território nacional, referente ao mês de janeiro de 2017 .....29
- Figura 4.** Representação do mecanismo geral de oxidação lipídica, em que: RH - ácido graxo insaturado, R<sup>•</sup> - radical livre, ROO<sup>•</sup> - radical peróxido e ROOH - hidroperóxido .....30
- Figura 5.** Estruturas moleculares dos SPAs BHA, TBHQ, BHT e PG (adaptado).....32
- Figura 6.** Representação do mecanismo geral de ação dos antioxidantes, em que: AH - antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo, R<sup>•</sup> e ROO<sup>•</sup> - radicais livres e A<sup>•</sup> - radical inerte .....32
- Figura 7.** Representação esquemática dos tipos de microemulsões conforme classificação de Winsor, em que as regiões hachuradas correspondem a sistemas microemulsionados e as regiões em branco correspondem às fases livres (adaptado) .....34
- Figura 8.** Representação esquemática: (A) Microemulsão água em óleo, (B) Microemulsão óleo em água (adaptado).....36
- Figura 9.** Representação esquemática de um diagrama de fases ternário de um sistema genérico composto por água (A), óleo (O) e co-surfactante (S) (adaptado).....37
- Figura 10.** Representação esquemática de um sistema GC com detector de espectrometria de massas do tipo quadrupolar (qMS).....39
- Figura 11.** Modelos estruturais de fibras de carbono (cortes transversais) (adaptado) .....43
- Figura 12.** Representação do sinal de excitação potencial x tempo para DPV (adaptado).....45
- Figura 13.** Representação esquemática dos voltamogramas de onda quadrada: (1) Processo redox de um sistema reversível, (2) Processo redox de um sistema irreversível (adaptado). No exemplo,  $I_{\text{resultante}} = [I_{\text{direta}} - (-I_{\text{reversa}})]$  .....46
- Figura 14.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de etanol contendo  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$ : (a) Ausência de TBHQ; (b - f) Presença de concentrações crescentes de TBHQ. Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,000 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt .....55
- Figura 15.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de biodiesel:etanol 1:1 (v/v) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$ : (a - f) Concentrações de PG variando de

$8,60 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  a  $4,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,200 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt .....56

**Figura 16.** Curva de calibração para quantificação individual de PG em biodiesel:etanol 1:1 (v/v) de acordo com a Figura 15 .....57

**Figura 17.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de biodiesel:etanol 1:1 (v/v) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$ : (a - h) Concentrações de TBHQ variando de  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  a  $8,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,200 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt .....58

**Figura 18.** Curva de calibração para quantificação individual de TBHQ em biodiesel:etanol 1:1 (v/v) de acordo com a Figura 17 .....59

**Figura 19.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de biodiesel:etanol 1:1 (v/v) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$  e  $3,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de PG: (a) Ausência de TBHQ, (b - i) Concentrações de TBHQ de  $1,20 \times 10^{-3}$  a  $8,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,200 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.....60

**Figura 20.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de biodiesel:etanol 1:1 (v/v) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$  e  $4,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ: (a) Ausência de PG, (b - i) Concentrações de PG de  $9,3 \times 10^{-4}$  a  $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,200 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt .....60

**Figura 21.** Curva de calibração para quantificação individual de TBHQ, em biodiesel:etanol 1:1 (v/v), em presença de  $3,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de PG, de acordo com a Figura 19 .....61

**Figura 22.** Curva de calibração para quantificação individual de PG, em biodiesel:etanol 1:1 (v/v), em presença de  $4,30 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ, de acordo com a Figura 20 .....61

**Figura 23.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de biodiesel:etanol 1:1 (v/v) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$ : Adições sucessivas de TBHQ de  $1,20 \times 10^{-3}$  a  $8,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e de PG de  $9,3 \times 10^{-4}$  a  $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  após obtenção de 10 brancos estáveis. Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,200 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt .....62

**Figura 24.** Dados obtidos a partir do procedimento de deconvolução referente aos voltamogramas da Figura 23.....63

**Figura 25.** Curvas de adição de padrão para determinação simultânea de TBHQ e PG de acordo com a deconvolução da Figura 24 .....63

**Figura 26.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de biodiesel:etanol 1:1 (v/v) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$ : (a) Amostras de biodiesel fortificadas com  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ e  $9,40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de PG, (b - i) Adições sucessivas de ambos

antioxidantes, após obtenção de 10 brancos estáveis. Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,100 V, velocidade de varredura de 5 mV s<sup>-1</sup>, amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletródo e quasi-referência em Pt .....65

**Figura 27.** Dados obtidos a partir do procedimento de deconvolução referente aos voltamogramas da Figura 26.....65

**Figura 28.** Curvas de adição de padrão para determinação simultânea de TBHQ e PG de acordo com a deconvolução da Figura 27 .....66

**Figura 29.** Diagrama de fases ternário de misturas de biodiesel, água e *n*-propanol (m/m), a 25 °C, em que: (I) Região de imiscibilidade, (II) Região de miscibilidade. A intersecção entre os pontos ○ e ▲ indica a SFME empregada no presente estudo (71% *n*-propanol, 11% água e 18% biodiesel).....67

**Figura 30.** Variação da condutividade elétrica  $\kappa$  em função do teor de biodiesel (teor de água constante) para os sistemas correspondentes aos pontos representados por ○ na Figura 29. O ponto assinalado em vermelho representa a SFME usada no estudo .....68

**Figura 31.** Valores de condutividade elétrica  $\kappa$  da Figura 30 ajustados com um polinômio, em função do teor de biodiesel (% , m/m). Sistema com composição correspondente aos pontos representados por ○ na Figura 29 .....69

**Figura 32.** Derivada do ajuste polinomial dos valores de condutividade elétrica  $\kappa$  em função do teor de biodiesel (% , m/m). Sistema com composição correspondente aos pontos representados por ○ na Figura 29 .....70

**Figura 33.** Condutividade elétrica  $\kappa$  em função do teor de água ( $R_{B/P}$  constante em 1:4) para os sistemas correspondentes aos pontos representados por ▲ na Figura 29. O ponto assinalado em vermelho representa a SFME usada no estudo.....70

**Figura 34.** Ajuste polinomial dos valores de condutividade da Figura 33 em função do teor de água (% , m/m). Sistema com composição correspondente aos pontos representados por ▲ na Figura 29 .....71

**Figura 35.** Derivada do ajuste polinomial dos valores de condutividade elétrica  $\kappa$  da Figura 33 em função do teor de água (% , m/m). Sistema com composição correspondente aos pontos representados por ▲ na Figura 29 .....72

**Figura 36.** Voltamogramas obtidos por LV em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) em SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo 0,02 mol L<sup>-1</sup> de N(Butyl)<sub>4</sub>BF<sub>4</sub>, sem adição de antioxidantes: (a) Ausência de ferroceno, (b) Presença de 8,00×10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de ferroceno, (c) Presença de 1,60×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> de ferroceno. Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,000 V, velocidade de varredura de 5 mV s<sup>-1</sup>. Contra-eletródo e quasi-referência em Pt .....73

**Figura 37.** Voltamogramas de pulso diferencial em CFM tipo I de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel) contendo 0,02 mol L<sup>-1</sup> de N(Butyl)<sub>4</sub>BF<sub>4</sub>: (a) Ausência de TBHQ, (b) Presença de 6,9×10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de TBHQ. Faixa de potencial entre

0,000 V e 1,000 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt ..... 75

**Figura 38.** Voltamogramas de pulso diferencial em CFM tipo I de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$  na presença de  $6,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ: (a) Sem pré-tratamento, (b) Com pré-tratamento. Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,000 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt ..... 76

**Figura 39.** Voltamogramas de pulso diferencial em CFM tipo I de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ , após lavagem do eletrodo com solução de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ : (a) Ausência de TBHQ, (b) Presença de  $6,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ, (c) Presença de  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ. Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,100 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt ..... 77

**Figura 40.** Voltamogramas de pulso diferencial em CFM tipo I de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ , na presença de TBHQ e BHT, nas concentrações de  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $7,70 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente, após lavagem do eletrodo com KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,100 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt ..... 78

**Figura 41.** Voltamogramas de onda quadrada em CFM tipo I de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ , na presença de TBHQ e BHT, nas concentrações de  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $7,70 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente, após lavagem do eletrodo com KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,100 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt ..... 79

**Figura 42.** Voltamogramas de pulso diferencial em ume de Au ( $r = 5 \text{ }\mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ , sem adição de antioxidantes: (a) Ausência de biodiesel, (b - g) Porcentagens crescentes de biodiesel (em volume) (0,3%, 0,6%, 0,9%, 1,2%, 1,5% e 1,8%, respectivamente). Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,850 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV, largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt ..... 81

**Figura 43.** Voltamogramas de pulso diferencial em ume de Au ( $r = 5 \text{ }\mu\text{m}$ ) de *n*-propanol contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ , na ausência de biodiesel: (a) *n*-propanol puro, (b) Presença de  $2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ, (c) Presença de  $2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ e  $1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de BHT, (d - f) Concentrações crescentes de TBHQ ( $4,70 \times 10^{-4}$ ,  $6,90 \times 10^{-4}$  e  $9,05 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) e BHT ( $3,55 \times 10^{-4}$ ,  $5,20 \times 10^{-4}$  e  $6,80 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ). Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,850 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt ..... 82

**Figura 44.** Voltamogramas de pulso diferencial em ume de Au ( $r = 5 \text{ }\mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : (a - e) Concentrações de TBHQ entre  $1,20 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e  $2,40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,850 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt ..... 83

- Figura 45.** Curva de calibração para quantificação individual de TBHQ em SFME A/O de biodiesel de acordo com a Figura 44..... 84
- Figura 46.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : (a - e) Concentrações de BHT entre  $9,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e  $3,56 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,850 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt..... 85
- Figura 47.** Curva de calibração para quantificação individual de BHT em SFME A/O de biodiesel de acordo com a Figura 46..... 86
- Figura 48.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : (a) Branco, (b) Presença de  $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de BHT, (c - j) Concentrações crescentes de TBHQ de  $5,76 \times 10^{-5}$  a  $4,46 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  na presença de  $3,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de BHT. Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,700 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt..... 87
- Figura 49.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : (a) Branco, (b) Presença de  $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ, (c - j) Concentrações crescentes de BHT de  $8,73 \times 10^{-5}$  a  $6,54 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  na presença de  $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ. Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,700 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt..... 88
- Figura 50.** Curva de calibração para a quantificação individual de TBHQ, em presença de  $3,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de BHT em SFME A/O de biodiesel de acordo com a Figura 48..... 89
- Figura 51.** Curva de calibração para a quantificação individual de BHT, em presença de  $3,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ em SFME A/O de biodiesel de acordo com a Figura 49..... 89
- Figura 52.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : Adições sucessivas de TBHQ de  $6,02 \times 10^{-5}$  a  $4,46 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e de BHT de  $4,54 \times 10^{-5}$  a  $3,36 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,700 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt..... 90
- Figura 53.** Dados obtidos a partir do procedimento de deconvolução referente aos voltamogramas da Figura 52..... 91
- Figura 54.** Curvas de adição de padrão para determinação simultânea de TBHQ e BHT de acordo com a deconvolução da Figura 53 ..... 91
- Figura 55.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : (a) Branco, (b) Amostras de biodiesel fortificadas com  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de

TBHQ e  $9,08 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de BHT, (c - h) Adições sucessivas de ambos antioxidantes. Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,850 V, velocidade de varredura de 5 mV s<sup>-1</sup>, amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt..... 93

**Figura 56.** Dados obtidos a partir do procedimento de deconvolução referente aos voltamogramas da Figura 55..... 93

**Figura 57.** Curvas de adição de padrão para determinação simultânea de TBHQ e BHT de acordo com a deconvolução da Figura 56 ..... 94

**Figura 58.** Cromatograma por GC/qMS em metanol: (IS) fenol  $2,10 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, (1) BHA  $5,50 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, (2) BHT  $4,50 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, (3) TBHQ  $6,10 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Coluna Agilent HP-5ms (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm espessura), temperatura inicial 40 °C (por 2 min), rampas de 10 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C e de 30 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C, amostras (1 μL) injetadas a 300 °C com *split ratio* 1:10, fluxo do gás carreador He 1,5 mL min<sup>-1</sup>..... 95

**Figura 59.** Cromatograma por GC/qMS de amostra de biodiesel fortificada com BHA, BHT e TBHQ ( $2,80 \times 10^{-3}$ ,  $2,30 \times 10^{-3}$  e  $3,00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente). Coluna Agilent HP-5ms (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm espessura); temperatura inicial 40 °C (por 2 min), rampas de 10 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C e de 30 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C, amostras (1 μL) injetadas a 300 °C com *split ratio* 1:50, fluxo do gás carreador He 1,5 mL min<sup>-1</sup>. Amostra de biodiesel diluída 50 vezes em metanol ..... 96

**Figura 60.** Cromatograma por GC/qMS de amostra de biodiesel fortificada com BHA, BHT e TBHQ ( $2,80 \times 10^{-3}$ ,  $2,30 \times 10^{-3}$  e  $3,00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente): (1) Éster octanoato, (2) Éster decanoato, (3) BHA, (4) BHT, (5) Éster dodecanoato, (6) TBHQ, (7) Éster tridecanoato. Coluna Agilent HP-5ms (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm espessura), temperatura inicial 40 °C (por 2 min), rampas de 10 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C e de 30 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C, amostras (1 μL) injetadas a 300 °C com *split ratio* 1:10, fluxo do gás carreador He 1,5 mL min<sup>-1</sup>. Detector desligado após 16 minutos de corrida. Amostra de biodiesel diluída 50 vezes em metanol ..... 97

**Figura 61.** Curva de calibração para BHA gerada a partir de análises GC/qMS, com concentração variando entre 5 e 25 mg L<sup>-1</sup> ( $2,80 \times 10^{-2}$  e  $1,40 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>)..... 98

**Figura 62.** Curva de calibração para BHT gerada a partir de análises GC/qMS, com concentração variando entre 5 e 25 mg L<sup>-1</sup> ( $2,30 \times 10^{-2}$  e  $1,15 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>)..... 98

**Figura 63.** Curva de calibração para TBHQ gerada a partir de análises GC/qMS, com concentração variando entre 5 e 25 mg L<sup>-1</sup> ( $3,00 \times 10^{-2}$  e  $1,50 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>)..... 99

**Figura 64.** Cromatogramas por HPLC-UV de amostra de biodiesel fortificada com BHA, BHT, TBHQ e PG ( $3,40 \times 10^{-3}$ ,  $3,20 \times 10^{-3}$ ,  $4,20 \times 10^{-3}$  e  $3,30 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente): (IS) Padrão interno *p*-xileno, (1) PG, (2) TBHQ, (3) BHA e (4) BHT. Coluna C18 (Grace Alltech Alltima 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 μm partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 3 min) com aumento linear até 90% v/v, mantendo-se por 27 min e aumentando até 100% v/v por 0,2 min; equilíbrio a 50% v/v de B por 1,8 min antes da injeção seguinte. Amostras (10 μL) injetadas em um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, previamente diluídas 20 vezes em metanol v/v. Comprimento de onda de 280 nm..... 100

**Figura 65.** Cromatogramas por HPLC-UV de amostra de biodiesel fortificada com BHA, BHT, TBHQ e PG ( $3,40 \times 10^{-3}$ ,  $3,20 \times 10^{-3}$ ,  $4,20 \times 10^{-3}$  e  $3,30 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente): (IS) Padrão interno fenol, (1) PG, (2) TBHQ, (3) BHA e (4) BHT. Coluna Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 μm partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 17 min) com aumento linear até 100% v/v, mantendo-se por 13 min; equilíbrio a 50% v/v de B por 5 min antes da injeção seguinte. Amostras (5 μL) injetadas em um fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, previamente diluídas 20 vezes em metanol v/v. Comprimento de onda de 280 nm..... 101

**Figura 66.** Cromatogramas por HPLC-UV em metanol com BHA, BHT, TBHQ e PG ( $3,40 \times 10^{-3}$ ,  $3,20 \times 10^{-3}$ ,  $4,20 \times 10^{-3}$  e  $3,30 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente) individualmente. Coluna Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 μm partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 17 min) com aumento linear até 100% v/v, mantendo-se por 13 min; equilíbrio a 50% v/v de B por 5 min antes da injeção seguinte. Amostras (5 μL) injetadas em um fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> ..... 102

**Figura 67.** Curva de calibração para BHA gerada a partir de análises HPLC-UV, com concentração variando entre 10 e 80 mg L<sup>-1</sup> ( $5,55 \times 10^{-2}$  e  $4,40 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>). Comprimento de onda de 290 nm..... 103

**Figura 68.** Curva de calibração para BHT gerada a partir de análises HPLC-UV, com concentração variando entre 10 e 80 mg L<sup>-1</sup> ( $4,55 \times 10^{-2}$  e  $3,65 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>). Comprimento de onda de 280 nm..... 103

**Figura 69.** Curva de calibração para TBHQ gerada a partir de análises HPLC-UV, com concentração variando entre 10 e 80 mg L<sup>-1</sup> ( $6,00 \times 10^{-2}$  e  $4,80 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>). Comprimento de onda de 290 nm..... 104

**Figura 70.** Curva de calibração para PG gerada a partir de análises HPLC-UV, com concentração variando entre 10 e 80 mg L<sup>-1</sup> ( $4,70 \times 10^{-2}$  e  $3,80 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>). Comprimento de onda de 270 nm..... 104

**Figura 71.** Mapa de íons obtido por UHPLC-ESI-Orbitrap/MS na análise de biodiesel fortificado com PG, TBHQ, BHA e BHT (1 mg L<sup>-1</sup> cada) nos modos (A) Negativo e (B) Positivo, com (C) Correspondentes cromatogramas de íons extraídos para os quatro antioxidantes: (1) PG, (2) TBHQ, (3) BHA, (4) BHT. Coluna Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 μm partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 17 minutos) com aumento linear até 100% v/v, mantendo-se por 13 minutos; equilíbrio a 50% v/v de B por 5 minutos antes da injeção seguinte. Amostras (15 μL) injetadas em um fluxo de 0,3 mL min<sup>-1</sup>. Fonte HESI operada nos modos positivo e negativo: gás de bainha 35, gás auxiliar 10, gás de varredura 0, voltagem do spray 3,0 kV, temperatura do capilar 320 °C e do aquecedor do gás auxiliar 300 °C. MS operado nos modos positivo e negativo em *full scan* (de 50 a 400 *m/z*): resolução de 70 000 FWHM, alvo AGC de  $1 \times 10^6$  e tempo máximo de injeção de 200 ms ..... 106

**Figura 72.** Cromatogramas por HPLC-UV de amostra de biodiesel sem adição de antioxidantes, ao longo de 8 semanas: (8 - 12) FAMEs mostrados na Tabela 6. Coluna Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 μm partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 17 min) com aumento linear até 100% v/v, mantendo-se por 13 min; equilíbrio a 50% v/v de B por 5 min antes da injeção seguinte.

Amostras (5  $\mu\text{L}$ ) injetadas em fluxo de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , previamente diluídas 20 vezes em metanol v/v. Comprimento de onda de 280 nm ..... 108

**Figura 73.** Cromatogramas por HPLC-UV de amostra de biodiesel com adição de BHA, BHT, TBHQ e PG (700 ppm cada), ao longo de 8 semanas: (4) BHT, (8 - 12) FAMES mostrados na Tabela 6. Coluna Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical  $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm i.d.} \times 5 \mu\text{m}$  partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 17 min) com aumento linear até 100% v/v, mantendo-se por 13 min; equilíbrio a 50% v/v de B por 5 min antes da injeção seguinte. Amostras (5  $\mu\text{L}$ ) injetadas em um fluxo de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , previamente diluídas 20 vezes em metanol v/v. Comprimento de onda de 280 nm ..... 109

**Figura 74.** Cromatogramas por HPLC-UV de amostra de biodiesel comercial com adição de BHT (600 - 800 ppm, conforme fabricante), ao longo de 8 semanas: (4) BHT, (8 - 12) FAMES mostrados na Tabela 6. Coluna Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical  $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm i.d.} \times 5 \mu\text{m}$  partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 17 min) com aumento linear até 100% v/v, mantendo-se por 13 min; equilíbrio a 50% v/v de B por 5 min antes da injeção seguinte. Amostras (5  $\mu\text{L}$ ) injetadas em um fluxo de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , previamente diluídas 20 vezes em metanol v/v. Comprimento de onda de 280 nm ..... 110

**Figura 75.** Perfil de estabilidade química de diferentes amostras de biodiesel após exposição à luz solar por até 8 semanas: (A) Teor total de FAME C18 (compostos 8 - 12 na Tabela 6) no biodiesel puro ( $\times$ ), amostra comercial fortificada com BHT (o) e amostra fortificada com os quatro antioxidantes ( $\Delta$ ); (B) Teor total de BHT em amostra comercial de biodiesel ( $\square$ ); (C) Teores de ( $\diamond$ ) PG, ( $\Delta$ ) TBHQ, (\*) BHA e ( $\square$ ) BHT em amostras de biodiesel fortificadas com os quatro antioxidantes. As barras de erro foram obtidas a partir de três replicatas dos experimentos ..... 111

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Nomenclatura e classificação das microemulsões conforme Winsor .....	34
<b>Tabela 2.</b> Figuras de mérito para determinação de TBHQ e PG em biodiesel:etanol 1:1 v/v .....	64
<b>Tabela 3.</b> Figuras de mérito para determinação de TBHQ e BHT em SFME A/O de biodiesel.....	92
<b>Tabela 4.</b> Figuras de mérito para determinação de BHA, BHT e TBHQ em biodiesel diluído em metanol por GC/qMS.....	99
<b>Tabela 5.</b> Figuras de mérito para determinação de BHA, BHT, TBHQ e PG em biodiesel diluído em metanol por HPLC-UV .....	105
<b>Tabela 6.</b> Perfil analítico do biodiesel por UHPLC-ESI-Orbitrap/MS.....	107

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
<b>AOCS</b>	<i>American Oil Chemists' Society</i>
<b>BHA</b>	Butil-hidroxianisol
<b>BHT</b>	Butil-hidroxitolueno
<b>CE</b>	Eletroforese Capilar
<b>CFM</b>	Microeletrodo de Fibra de Carbono
<b>CTAB</b>	Brometo de Cetiltrimetilamônio
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>D<sub>Fc</sub></b>	Coefficiente de Difusão do Ferroceno
<b>DLS</b>	Espalhamento de Luz Dinâmico
<b>DPV</b>	Voltametria de Pulso Diferencial
<b>E<sub>p</sub></b>	Potencial de Pico
<b>FAMEs</b>	Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
<b>Fc</b>	Ferroceno
<b>Fc<sup>+</sup></b>	Íon Ferricínio
<b>GC</b>	Cromatografia em Fase Gasosa
<b>HESI</b>	Fonte de Ionização Eletrospray Aquecida
<b>HPLC</b>	Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência
<b>i.d.</b>	Diâmetro Interno
<b>I<sub>lim</sub></b>	Corrente Limite
<b>IS</b>	Padrão Interno
<b>κ</b>	Condutividade Elétrica
<b>LC</b>	Cromatografia em Fase Líquida
<b>LD</b>	Limite de Detecção
<b>LQ</b>	Limite de Quantificação
<b>LV</b>	Voltametria Linear
<b>ME A/O</b>	Microemulsão do tipo água em óleo
<b>ME BC</b>	Microemulsão do tipo bicontínua
<b>ME O/A</b>	Microemulsão do tipo óleo em água
<b>N(Butyl)<sub>4</sub>BF<sub>4</sub></b>	Tetrafluoroborato de tetra- <i>n</i> -butilamônio
<b>N(Hex)<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub></b>	Perclorato de tetra-hexilamônio

<b>NMR</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>PG</b>	Galato de Propila
<b>qMS</b>	Detector de Espectrometria de Massas do tipo Quadrupolar
<b>R<sub>B/P</sub></b>	Razão de Biodiesel: <i>n</i> -propanol
<b>SANS</b>	Espalhamento de Nêutrons a Baixo Ângulo
<b>SAXS</b>	Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo
<b>SFME</b>	Microemulsão Livre de Surfactante
<b>SPA</b>	Antioxidante Fenólico Sintético
<b>SWV</b>	Voltametria de Onda Quadrada
<b>TBHQ</b>	<i>terc</i> -butil-hidroquinona
<b>TEM</b>	Microscopia de Transmissão de Elétrons
<b>UHPLC</b>	Cromatografia em Fase Líquida de Ultra Alta Performance
<b>ume</b>	Ultramicroeletrodo

## RESUMO

As especificações do biodiesel são garantidas por um rigoroso controle de qualidade; entre outros parâmetros, a quantificação de antioxidantes é fundamental para assegurar um produto satisfatório para comercialização. No presente estudo, foram desenvolvidas técnicas voltamétricas e cromatográficas para análise direta de BHA, TBHQ, BHT e PG em biodiesel. Medidas por voltametria de pulso diferencial (DPV) em mistura biodiesel:etanol 1:1 (v/v), contendo perclorato de tetra-hexilamônio como eletrólito suporte e empregando ultramicroeletrodo (ume) de Pt, mostraram picos da corrente diferencial de oxidação bem definidos para TBHQ e PG, sendo obtidos gráficos de calibração lineares na faixa de concentrações de  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Analogamente, empregando um ume de Au em microemulsão de biodiesel livre de surfactante (SFME) contendo tetrafluoroborato de tetra-*n*-butilamônio, medidas por DPV apresentaram picos da corrente diferencial bem definidos para TBHQ e BHT. Para esses compostos, foram obtidos gráficos de calibração lineares na faixa de concentrações de  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Em ambos os casos, devido à sobreposição dos voltamogramas, os teores de antioxidantes foram calculados por um procedimento matemático de deconvolução empregando o *software* Origin 8.0<sup>®</sup>. A quantificação de BHA, BHT e TBHQ por cromatografia GC/qMS em biodiesel diluído em metanol apresentou linearidade entre 5 e 25 mg L<sup>-1</sup>, para cada um dos antioxidantes. Medidas por HPLC em fase reversa com coluna fenólica apresentaram boa separação dos picos cromatográficos na análise simultânea de BHA, BHT, TBHQ e PG assim como curvas de calibração com linearidade entre 10 e 80 mg L<sup>-1</sup>, para cada um dos antioxidantes. A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs) no biodiesel foi realizada por UHPLC-ESI-Orbitrap/MS; os teores de FAMEs e antioxidantes permaneceram estáveis nas amostras fortificadas mesmo após 8 semanas de exposição à luz solar, porém diminuíram significativamente em amostras não-fortificadas. As metodologias propostas são de fácil preparo e baixo consumo de amostra, podendo vir a ser do interesse da indústria para o monitoramento de antioxidantes em biodiesel, na linha de produção. A principal vantagem é não ser necessário nenhum tipo de pré-tratamento da amostra: a simples diluição em metanol ou etanol ou a preparação do biodiesel na forma de SFME conferem rapidez e simplicidade à determinação dos antioxidantes investigados.

### Palavras-chave

Biodiesel; Antioxidantes fenólicos sintéticos; Voltametria de pulso diferencial; Cromatografia a líquido; Determinação simultânea.

## ABSTRACT

Biodiesel features are assured by strict quality control procedures; among those, antioxidants quantification is essential to guarantee a good and satisfactory final product for commercialization. In the present study, voltammetric and chromatographic methodologies were developed for direct analyses techniques of BHA, TBHQ, BHT and PG in biodiesel. Differential pulse voltammetry (DPV) in biodiesel:ethanol 1:1 (v/v), with tetrahexylammonium perchlorate as supporting electrolyte at a Pt ultramicroelectrode (ume), presented well-defined oxidation peaks for TBHQ and PG, with corresponding linear calibration graphs in the range of  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Likewise, DPV at an Au ume in biodiesel surfactant-free microemulsion (SFME), with tetra-*n*-butylammonium tetrafluoroborate, presented well-defined oxidation peaks for TBHQ and BHT. For these compounds, linear calibration graphs were obtained in the range of  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. In both techniques, due to significant voltammograms overlapping, amounts of antioxidants were calculated through mathematical deconvolution process using software Origin 8.0<sup>®</sup>. BHA, BHT and TBHQ quantification by GC/qMS in biodiesel diluted in methanol presented linearity between 5 and 25 mg L<sup>-1</sup> for each antioxidant. Reversed-phase liquid chromatography by HPLC using phenyl column showed good peak separation in simultaneous analysis of BHA, BHT, TBHQ and PG and calibration curves with linearity between 10 and 80 mg L<sup>-1</sup>. Biodiesel fatty acid methyl esters (FAMEs) identification was carried out by UHPLC-ESI-Orbitrap/MS; both FAMEs and antioxidants contents remained stable in spiked samples even after 8 weeks under sunlight exposure; in non-spiked samples, FAMEs content was significantly reduced. All proposed methodologies are easy to perform and present low sample consumption, which are interesting features for industry to monitor the aforementioned and other antioxidants in biodiesel. Their main advantage lies in the absence of any sample pre-treatment: the simple dilution in methanol or ethanol or biodiesel preparation as SFME deliver speed and simplicity for determination of target antioxidants.

### Keywords

Biodiesel; Synthetic phenolic antioxidants; Differential pulse voltammetry; Liquid chromatography; Simultaneous quantification.

# 1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda energética, os efeitos do aquecimento global e outros problemas ambientais decorrentes da queima de combustíveis fósseis são assuntos preocupantes para a sociedade. Considerando que os setores de eletricidade e transporte são os principais responsáveis pela emissão de gases que causam o efeito estufa, que a quantidade de veículos cresce rapidamente, não só no Brasil como no mundo, e que a quase totalidade desses veículos é movida à base de combustíveis fósseis, busca-se atualmente utilizar fontes de energia renováveis, *e.g.* solar, biomassa, eólica e geotérmica. Entre essas, o biodiesel apresenta a vantagem de poder ser empregado em motores de ignição por compressão sem comprometer seu funcionamento.<sup>1-3</sup>

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), biocombustíveis são definidos como substâncias derivadas de biomassa renovável, podendo substituir, parcial ou totalmente, combustíveis fósseis em motores. Atualmente, cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos no Brasil são renováveis, sendo o etanol (obtido a partir da cana-de-açúcar) e o biodiesel os dois principais biocombustíveis usados no país.<sup>4</sup>

O biodiesel é definido como um combustível biodegradável produzido a partir de fontes renováveis, como gorduras animais ou óleos vegetais; tecnicamente, o biodiesel é um alquil éster de ácidos graxos, obtido pelo processo de transesterificação de óleos ou gorduras. Um aspecto que restringe seu uso é a baixa estabilidade frente à oxidação, a qual é intensificada com o aumento do número de insaturações na cadeia carbônica.<sup>5,6</sup> Entretanto, é possível aumentar essa estabilidade com a adição de antioxidantes fenólicos sintéticos (SPAs, do inglês *synthetic phenolic antioxidants*), comumente usados em alimentos.<sup>7-9</sup>

Esses compostos têm sido extensivamente investigados por eletroanálise. Já nos anos 1920, estudos eletroquímicos sobre oxidação-redução de fenóis e quinonas foram relatados utilizando técnicas potenciométricas para a determinação de potenciais de redução.<sup>10-12</sup> Passadas três décadas, em 1953, após resultados bem-sucedidos de Julian e Ruby<sup>13</sup> na determinação de potenciais de meia onda, Hedenburg e Frieser<sup>14</sup> desenvolveram um método quantitativo de análise de fenol usando a mesma técnica. Os resultados mostraram que a voltametria linear em um microeletrodo de Pt em solução tampão de dioxano:água 1:1, contendo nitrato de potássio como eletrólito, permitiu a diferenciação entre os diferentes fenóis.

Antioxidantes fenólicos sintéticos têm sido amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de combustíveis. Técnicas de quantificação eletroanalítica em diferentes amostras foram propostas usando vários tipos de eletrodos, *e.g.* eletrodo gotejante de mercúrio,<sup>15</sup> fio de platina coplanar revestido com Nafion e sonda eletroquímica,<sup>16</sup> eletrodo de ouro modificado,<sup>17</sup> sensor molecular impresso<sup>18</sup> e biosensor enzimático.<sup>19</sup>

Atualmente, entre os métodos analíticos empregados para identificar e quantificar SPAs, destacam-se métodos voltamétricos<sup>20-24</sup> e cromatográficos.<sup>25-29</sup> Dentre esses últimos, predominam as cromatografias em fase líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e em fase gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e a eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*), sendo que HPLC e GC são as técnicas mais utilizadas.

Industrialmente, a avaliação da eficácia dos antioxidantes em prevenir a degradação oxidativa é feita pelo ensaio de oxidação acelerada (período de indução Rancimat), o qual demanda um tempo elevado entre a preparação e a execução do ensaio. Desse modo, é importante o desenvolvimento de uma metodologia cujos resultados sejam compatíveis com os obtidos pelo Rancimat e que possa ser feita em menos tempo.

Na análise cromatográfica e na eletroanálise, o preparo de amostras hidrofóbicas por diluição em solvente adequado implica em menor tempo de análise, redução de custos e volume de reagentes empregados. Por sua vez, a utilização de microemulsões como meio de análise também apresenta vantagens como alta estabilidade e boas propriedades condutoras (por vezes maiores que a de solventes orgânicos), além da capacidade de solubilizarem substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, tornando-as extremamente atrativas para variadas aplicações.

No presente estudo, empregaram-se técnicas voltamétricas e cromatográficas para identificar e quantificar SPAs em amostras de biodiesel por análise direta, sendo as amostras preparadas como microemulsões livres de surfactante (SFMEs, do inglês *surfactant-free microemulsions*) e, também, por diluição em etanol e metanol.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Este estudo teve por objetivo geral o desenvolvimento de metodologias para análise direta de antioxidantes fenólicos sintéticos em amostras de biodiesel (de óleo de soja e de óleo

residual de fritura (canola e girassol)) por métodos eletroanalíticos e cromatográficos sem extração ou pré-concentração.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

O presente trabalho visou:

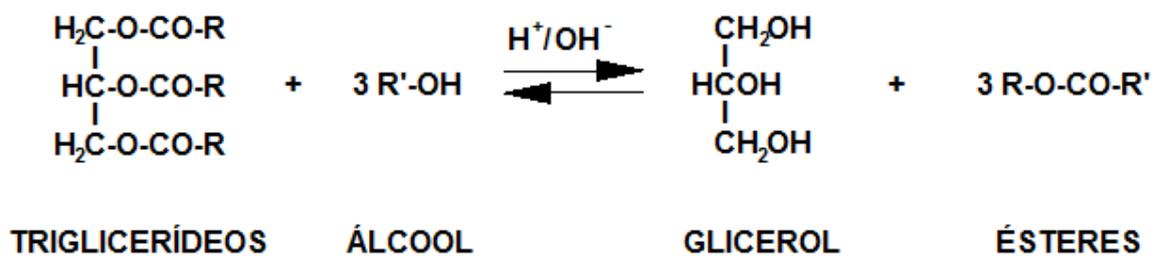
- i. Determinar e quantificar simultaneamente dois SPAs em meio biodiesel:etanol por voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) em ultramicroeletrodo (ume) de Pt avaliando as respostas eletroquímicas dos SPAs, bem como determinar as figuras de mérito para cada um deles;
- ii. Preparar e caracterizar uma microemulsão sem surfactante (SFME), composta de água/biodiesel/*n*-propanol, como meio para análise por DPV;
- iii. Determinar e quantificar simultaneamente dois SPAs em SFME de biodiesel por meio de DPV e voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) em microeletrodo de fibra de carbono (CFM, do inglês *carbon fiber microelectrode*), avaliando a viabilidade do uso desse tipo de eletrodo no meio estudado e as respostas dos analitos;
- iv. Determinar e quantificar simultaneamente dois SPAs em SFME de biodiesel por meio de DPV em ume de Au, avaliando as respostas eletroquímicas dos SPAs, bem como determinar suas figuras de mérito;
- v. Determinar e quantificar simultaneamente quatro SPAs em meio biodiesel:metanol 1:1 (v/v) por meio de HPLC e GC, construir as respectivas curvas de calibração e determinar figuras de mérito;
- vi. Avaliar, por meio da técnica de HPLC, a degradação do biodiesel exposto ao ar, luz e temperatura ambiente, tanto em amostras livres de SPAs como fortificadas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIODIESEL

De acordo com a ANP, em 2003 foram iniciados os primeiros estudos referentes à criação de uma política para o biodiesel no Brasil, com a criação da Comissão Executiva Interministerial do Biodiesel e do Grupo Gestor pelo governo federal. Com o lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, em 2004, a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira tornou-se seu principal objetivo; nesse mesmo ano, a mistura ao Diesel em um teor de 2% começou a ser feita em caráter experimental, sendo voluntária entre 2005 e 2007. O artigo 2º da Lei nº 11.097/2005 efetivou o biodiesel na matriz energética brasileira; em 2008, entrou em vigor a obrigatoriedade da mistura de 2% de biodiesel ao Diesel, aumentando esse valor para 7% em novembro de 2014, 8% até março de 2017, 9% até março de 2018 e 10% até março de 2019, fortalecendo assim a participação do biodiesel na matriz energética nacional.<sup>30</sup> Segundo a ANP, existem hoje no Brasil 51 plantas produtoras de biodiesel autorizadas para operação, com capacidade total de 20.930,81 m<sup>3</sup>/dia, sendo que as regiões com maior produção são o Centro-Oeste e o Sul, com 8.121,25 e 8.112,33 m<sup>3</sup>/dia, respectivamente.<sup>31</sup>

O biodiesel se caracteriza por ser um combustível renovável e biodegradável, cujo uso se encontra em escala crescente, seja devido à finitude dos combustíveis fósseis ou à preocupação com a poluição ambiental.<sup>1,2,32-35</sup> Sua composição química consiste em cadeias longas de mono-álquil ésteres (metílicos ou etílicos) de ácidos graxos, sendo, em geral, obtido a partir da reação entre um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) e um óleo vegetal/gordura animal na presença de um catalisador, reação essa conhecida como transesterificação, apresentada na Figura 1.<sup>23</sup> A transesterificação gera alguns subprodutos, como ácidos graxos livres e glicerol, que precisam ser controlados para não danificar os motores nem prejudicar as propriedades do próprio biocombustível.<sup>32,33,36</sup>

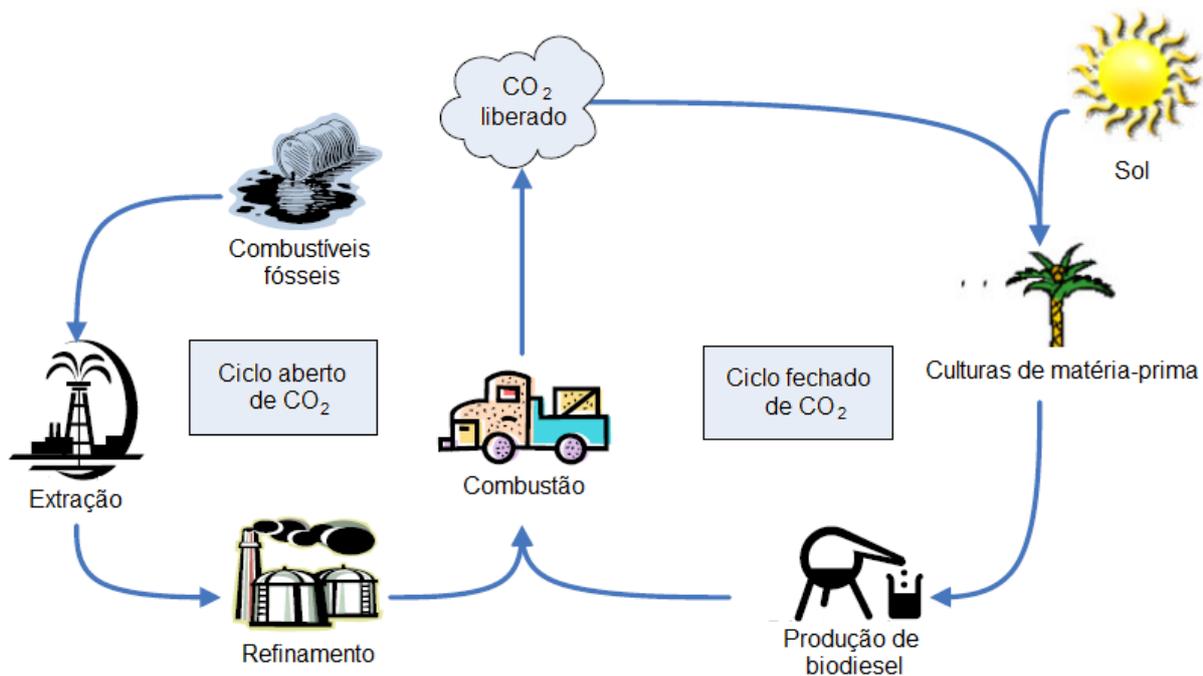


**Figura 1.** Esquema geral da reação de transesterificação, em que: R - cadeia carbônica dos ácidos graxos e R' - cadeia carbônica do álcool reagente.<sup>37</sup>

Para que o biodiesel atenda às especificações de qualidade, a reação de transesterificação deve ser suficientemente completa e os ésteres metílicos/etílicos devem ser adequadamente purificados. Para Pullen *et al*<sup>38</sup> e Balat *et al*,<sup>39</sup> o principal objetivo da transesterificação é diminuir a viscosidade dos óleos vegetais para valores próximos aos observados no petro-Diesel, uma vez que a elevada viscosidade dos triglicerídeos dificulta sua injeção na câmara de combustão, causando problemas operacionais nos motores, *e.g.* formação de depósitos e eventual falha em seu funcionamento.

O biodiesel apresenta diversas vantagens sobre os combustíveis fósseis, tais como: biodegradabilidade, baixa toxicidade,<sup>40</sup> ausência de enxofre e compostos aromáticos, elevado número de cetano e ponto de fulgor (que proporcionam segurança no manuseio e armazenamento), médio teor de oxigênio e baixa emissão de HC, CO e CO<sub>2</sub>.<sup>1,23,38</sup> Ainda oferece uma maior lubricidade se comparado a alguns petro-combustíveis de baixo teor de enxofre, o que ajuda a reduzir o desgaste de componentes de motores.<sup>38</sup> Além disso, é miscível ao petro-Diesel em qualquer proporção, desde que realizada nas condições adequadas, o que aumenta ainda mais sua utilização. Tal característica ocorre devido à grande similaridade de propriedades<sup>39</sup> entre biodiesel e Diesel; a essa mistura dá-se o nome de BX, em que “X” corresponde à porcentagem de biodiesel na blenda.<sup>41</sup> Essa similaridade permite que o biodiesel seja utilizado nos motores a Diesel sem que esses sofram grandes modificações.<sup>32-34,38,42</sup>

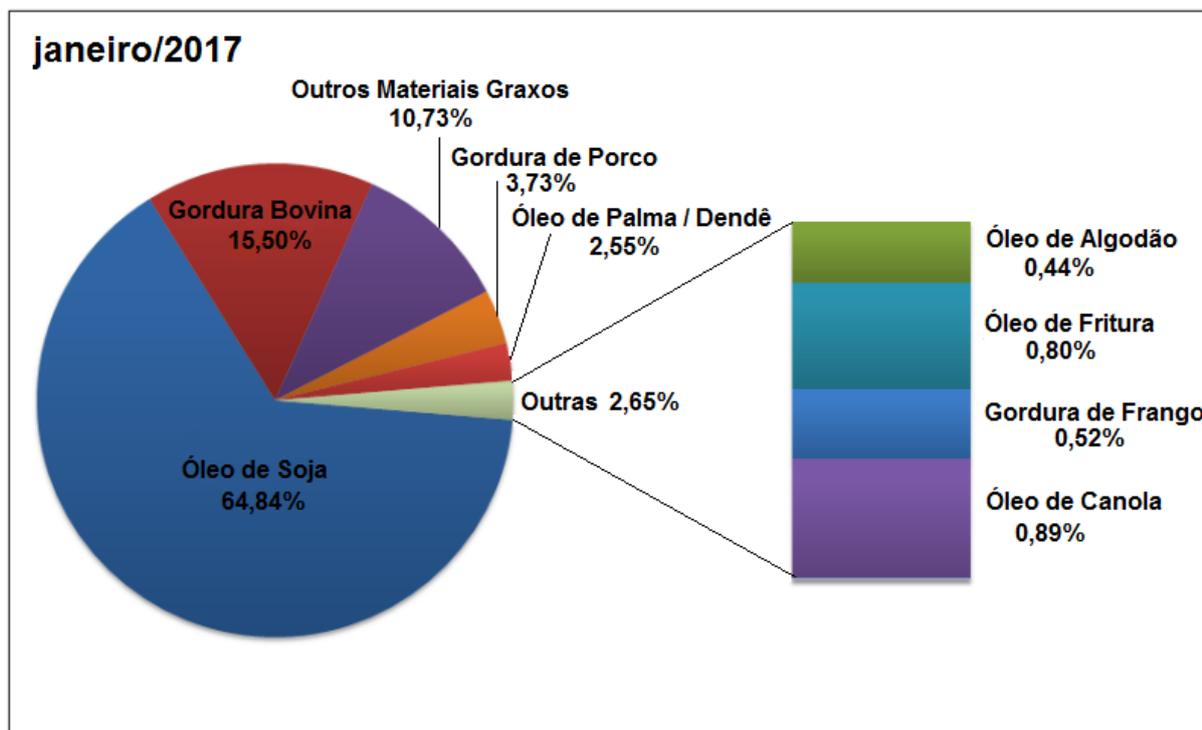
O biodiesel ainda apresenta uma grande sensibilização ambiental devido à possibilidade de redução da emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera, uma vez que todo o gás liberado pela combustão do biodiesel é reciclado na próxima geração de cultura usada como matéria-prima na produção do mesmo, como mostrado na Figura 2.



**Figura 2.** Esquema do ciclo do CO<sub>2</sub> para biodiesel e combustíveis fósseis (adaptado).<sup>42</sup>

O biodiesel também apresenta algumas desvantagens se comparado a petrocombustíveis: pode solidificar a baixas temperaturas, o que ocasiona a interrupção do fluxo do biocombustível e posterior entupimento do sistema de filtração; é solvente de compostos elastoméricos, como borrachas, o que requer que componentes feitos desse material devam ser protegidos ou substituídos;<sup>41</sup> possui menor estabilidade frente à oxidação, a qual é favorecida por fatores como o contato com o ar e o aumento de insaturações na cadeia carbônica,<sup>6,43-45</sup> sendo atualmente motivo de diversos estudos.

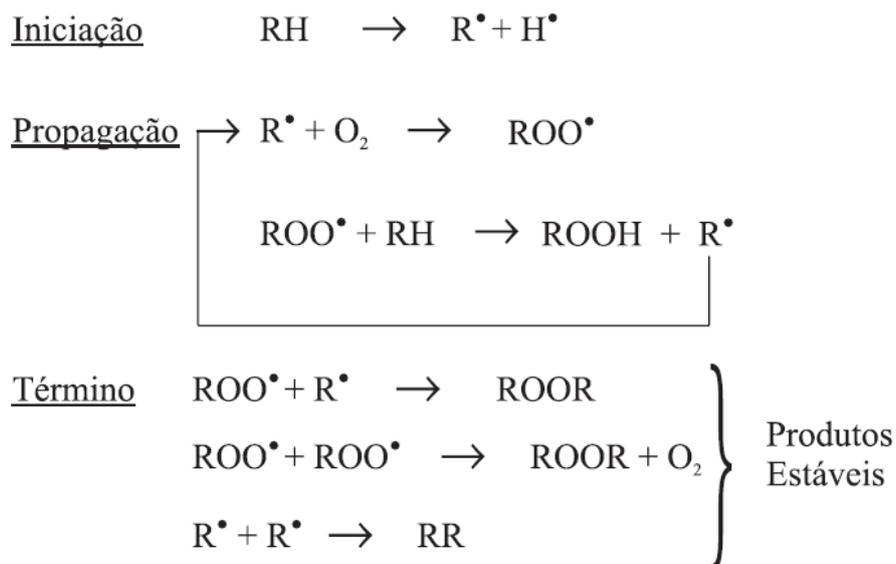
As matérias-primas utilizadas para a obtenção do biodiesel apresentam altos níveis de ácidos graxos insaturados, *e.g.* óleo de soja, o qual é composto de ácidos linoleico (53%), oleico (23%), palmítico (11%), linolênico (8%) e esteárico (4%), tornando-o susceptível à oxidação; tal característica é inevitavelmente transferida para os ésteres metílicos ou etílicos obtidos a partir desses materiais.<sup>46-48</sup> A Figura 3 mostra o percentual das matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil.



**Figura 3.** Percentual das matérias-primas empregadas na produção de biodiesel em território nacional, referente ao mês de janeiro de 2017.<sup>31</sup>

## 2.2 ESTABILIDADE OXIDATIVA DO BIODIESEL

Sabe-se que o processo de autoxidação é o principal mecanismo de degradação do biodiesel (Figura 4), resultando em produtos finais estáveis como álcoois, aldeídos e ácidos carboxílicos.<sup>49,50</sup> Nessa reação, a etapa inicial ocorre com a formação do radical livre do éster por meio da remoção de um átomo de hidrogênio do carbono alílico. Em seguida, quaisquer radicais livres susceptíveis a ataques do oxigênio são convertidos em outros radicais, que por sua vez dão origem aos produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos). Por fim, o término da reação consiste na formação, por meio de rearranjo dos produtos primários, de produtos finais estáveis (chamados de produtos secundários de oxidação), mencionados anteriormente. Tais produtos são indesejáveis e podem causar: aumento de contaminantes insolúveis, da viscosidade e da acidez do biocombustível, bem como corrosão de motores e entupimento de filtros e sistemas de injeção.<sup>2,5,44,51</sup> A exposição ao calor, luz, umidade, oxigênio e contaminantes metálicos pode acelerar esse processo, sendo necessário proteger o biodiesel de tais fatores.<sup>32,33,43,52</sup>



**Figura 4.** Representação do mecanismo geral de oxidação lipídica, em que: RH - ácido graxo insaturado,  $\text{R}^\bullet$  - radical livre,  $\text{ROO}^\bullet$  - radical peróxido e  $\text{ROOH}$  - hidroperóxido.<sup>50</sup>

Batista *et al*<sup>40</sup> publicaram um estudo identificando compostos aldeídicos tóxicos decorrentes da degradação do biodiesel durante longo tempo de estocagem, entre eles 2-heptenal e 2-octenal, os quais podem ser considerados do mesmo grupo da acroleína (2-propenal). Sabe-se que a acroleína é uma substância extremamente tóxica, carcinogênica e mutagênica; dentro dessa família de compostos, os aldeídos insaturados apresentam maior toxicidade que os aldeídos saturados. Os autores identificaram os aldeídos tóxicos em amostras de biodiesel fresco, comercial e envelhecido (5 anos de estocagem), bem como em blendas de biodiesel fresco com biodiesel envelhecido, o que diminui a vida útil do biocombustível. Além disso, os autores concluíram que a presença de antioxidantes (naturais e sintéticos) retardam a formação dos aldeídos, mas não houve sinal de reação de tais produtos de degradação com os antioxidantes.

A estabilidade oxidativa do biodiesel (tempo decorrido para que ocorra um aumento acentuado na taxa de oxidação) é um parâmetro de extrema importância no controle de qualidade do biocombustível, a qual, em geral, é avaliada pelo método AOCS (*American Oil Chemists' Society*) de oxidação acelerada Rancimat (*Oxidative Stability Instrument AOCS Method Cd 12b-92*).<sup>2,6</sup> Para ser utilizado como biodiesel, um alquil éster deve apresentar estabilidade oxidativa de, pelo menos, seis horas por esse método, o qual consiste em acelerar a oxidação por meio de uma corrente de ar que borbulha através da amostra contida num tubo de reação selado e aquecido a 110 °C. Os produtos da decomposição de ácidos graxos são

transportados pela corrente de ar para um segundo recipiente contendo água destilada, cuja condutividade é monitorada continuamente. O tempo decorrido até o aparecimento de um aumento acentuado da condutividade (chamado de período de indução) indica a presença dos produtos de degradação do biodiesel.

A baixa estabilidade oxidativa do biodiesel durante o armazenamento, se comparada ao Diesel, foi investigada por Du Plessis *et al*<sup>53</sup> que publicaram, em 1985, um estudo sobre a estabilidade oxidativa de ésteres metílicos e etílicos de óleo de semente de girassol. Os autores concluíram que ésteres etílicos foram mais afetados pela oxidação do que os metílicos, provavelmente devido às pequenas diferenças no índice de acidez e no conteúdo de tocoferóis dos ésteres originais.

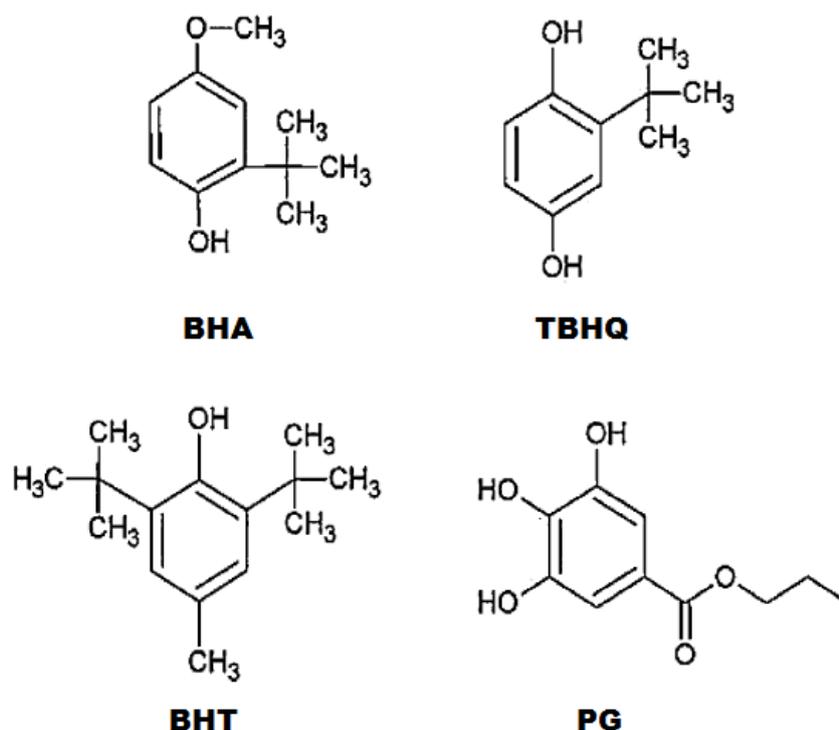
Conforme mostrado em estudo de Santos *et al*,<sup>43</sup> alguns antioxidantes volatilizam ou se decompõem na temperatura usada no ensaio, podendo resultar em um falso período de indução. Dessa forma, é importante o desenvolvimento de técnicas que sejam mais rápidas e igualmente confiáveis para quantificar antioxidantes no biocombustível.

## 2.3 ANTIOXIDANTES FENÓLICOS SINTÉTICOS

De acordo com Domingos *et al*<sup>46</sup> e Lôbo *et al*,<sup>44</sup> os antioxidantes naturais presentes nas matérias-primas utilizadas na produção do biodiesel permanecem apenas parcialmente no mesmo, em concentrações que dependem dos processos empregados na síntese do biocombustível. Dessa forma, dependendo da quantidade removida desses compostos ou ainda do grau de insaturação dos ésteres gerados, é extremamente necessária a adição de antioxidantes sintéticos para o uso futuro do biodiesel. Dunn<sup>54</sup> reportou diversos estudos que mostram que os antioxidantes sintéticos, adicionados em concentrações variando de 500 a 1000 mg L<sup>-1</sup>, são mais eficazes do que os naturais (mesmo quando em misturas).

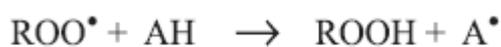
A adição de antioxidantes fenólicos sintéticos (SPAs) é uma maneira eficaz de aumentar a resistência do biodiesel<sup>45</sup> à oxidação, permitindo maiores tempos de estocagem. A literatura reporta estudos com diversos antioxidantes, dentre os quais os mais empregados e que têm apresentado melhores resultados são *tert*-butil-hidroquinona (TBHQ), galato de propila (PG), butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT).<sup>7,9,55</sup> No entanto, atualmente, por mais importante que seja determinar quantitativamente a presença de antioxidantes no biodiesel, as especificações de controle de qualidade não requerem esse procedimento.<sup>23</sup>

Na Figura 5 são mostradas as estruturas moleculares dos SPAs acima citados:



**Figura 5.** Estruturas moleculares dos SPAs BHA, TBHQ, BHT e PG (adaptado).<sup>56</sup>

Os SPAs interrompem as reações oxidativas em cadeia por meio da doação de um próton, formando radicais livres estáveis incapazes de iniciar ou propagar a oxidação lipídica (ver Figura 6). Assim sendo, devem ser adicionados imediatamente após a síntese do biocombustível, uma vez que não são capazes de reverter processos oxidativos já ocorridos.<sup>46</sup>



**Figura 6.** Representação do mecanismo geral de ação dos antioxidantes, em que: AH - antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo, R<sup>•</sup> e ROO<sup>•</sup> - radicais livres e A<sup>•</sup> - radical inerte.<sup>50</sup>

Além da função antioxidante, Almeida *et al*<sup>32</sup> relataram que o TBHQ também age como um inibidor de corrosão dos tanques de metal nos quais o biodiesel é armazenado. Apesar da importância do uso dos antioxidantes, sua adição aos biocombustíveis não é obrigatória, o que pode acarretar a formação dos produtos tóxicos estudados por Batista *et*

al,<sup>40</sup> levando a problemas de cunho ambiental e até mesmo à saúde humana. Assim sendo, um rígido controle de qualidade e métodos rápidos para sua quantificação devem ser desenvolvidos e aprimorados.

Diversos métodos têm sido aplicados para a detecção e quantificação de antioxidantes em biodiesel. Segundo Tavares,<sup>57</sup> GC e HPLC foram as primeiras técnicas de separação desenvolvidas, seguidas, na década de 1980, pela implementação da CE. Atualmente, a literatura reporta diversos estudos empregando as técnicas acima citadas para variadas análises em biodiesel, *e.g.* determinação de glicerol, ácidos graxos, metais e antioxidantes, normalmente utilizando processos de pré-concentração ou extração, com apenas alguns trabalhos citando a diluição do biocombustível em solvente orgânico.<sup>58-61</sup>

## 2.4 MICROEMULSÕES

Em 1943, Hoar e Schulman<sup>62</sup> publicaram um artigo sobre dispersões transparentes de água em óleo, atualmente chamadas de microemulsões. Nesse trabalho, os autores mencionam o então conhecido sistema composto por óleo - sabão alcali metálico - água, no qual o óleo era a fase contínua; a diluição desse sistema com excesso de água inverte-o para um sistema de óleo em água. O trabalho descreve ainda as “micelas sub-microscópicas”, cujo interior era composto de uma solução sabão-água e de moléculas anfifílicas não-ionizadas.

As microemulsões<sup>63-66</sup> são definidas como sistemas micro-heterogêneos formados por partículas nanométricas dispersas em fase contínua. São compostas, em geral, por óleo, água, um surfactante e um co-surfactante (álcool de cadeia média ou curta). Além de serem extremamente estáveis termodinamicamente, apresentam condutividade elétrica maior do que a maioria dos solventes orgânicos, bem como alta capacidade de solubilização tanto de substâncias hidrofílicas como hidrofóbicas, após ajustes adequados em sua composição.<sup>67</sup> A condutividade elétrica das microemulsões pode ser aumentada pela adição de um eletrólito suporte.<sup>68,69</sup> Sua formação e alta estabilidade decorrem da diminuição da tensão interfacial água-óleo causada pela presença do surfactante e do co-surfactante.<sup>70</sup>

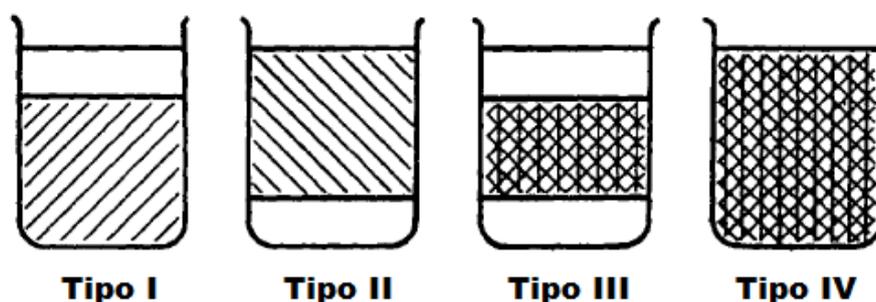
### 2.4.1 Classificação das Microemulsões

Em 1948, Winsor<sup>71</sup> publicou o primeiro estudo de uma série referente às microemulsões, no qual o autor apresenta os quatro tipos de sistemas originados a partir da

mistura, em variadas proporções, de água, óleo, surfactante e co-surfactante, chamada atualmente de “classificação Winsor”, mostrada na Tabela 1 e na Figura 7 a seguir.

**Tabela 1.** Nomenclatura e classificação das microemulsões conforme Winsor.

<b>Classificação Winsor</b>	<b>Fase dispersa/Fase contínua</b>
Tipo I	Microemulsão óleo em água em equilíbrio com excesso de fase oleosa
Tipo II	Microemulsão água em óleo em equilíbrio com excesso de fase aquosa
Tipo III	Fases livres de óleo e água em equilíbrio com uma terceira fase contendo água, óleo e surfactante
Tipo IV	Ausência de camadas livres com mútua solubilização de água, óleo e surfactante.



**Figura 7.** Representação esquemática dos tipos de microemulsões conforme classificação de Winsor, em que as regiões hachuradas correspondem a sistemas microemulsionados e as regiões em branco correspondem às fases livres (adaptado).<sup>71</sup>

A partir de ajustes adequados na proporção<sup>72</sup> dos componentes, é possível interconverter um tipo de microemulsão em outro. Moulik *et al*<sup>73</sup> afirmam que o processo de formação de uma microemulsão depende de uma série de fatores, *i.e.* natureza dos meios polar e apolar, temperatura, pressão, sendo que tanto as fases que constituem o sistema microemulsionado como sua estrutura interna sofrem influência de tais fatores.

A condutividade elétrica das microemulsões é uma característica bem conhecida, apresentando valores diferentes de acordo com o tipo de sistema. Em uma microemulsão do tipo óleo em água a condutividade se assemelha à observada para meios aquosos; no tipo água

em óleo o valor é relativamente baixo, enquanto que na bicontínua tem-se uma condutividade consideravelmente elevada.<sup>73</sup>

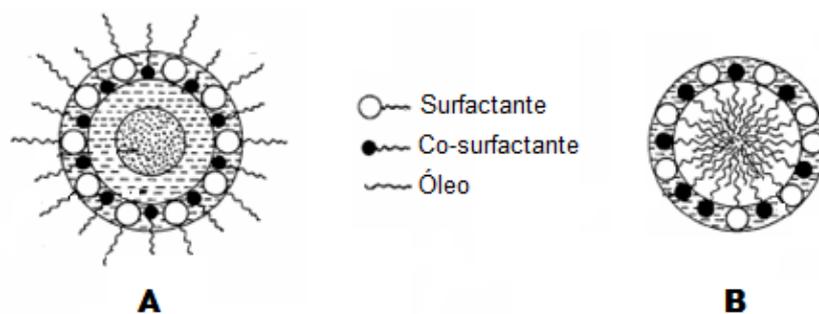
#### **2.4.2 Técnicas para Caracterização das Microemulsões**

A determinação da estrutura interna de uma microemulsão tem grande importância, podendo ser, no entanto, complexa. Atualmente, técnicas sofisticadas são empregadas com esse fim, como espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS, do inglês *Small Angle X-Ray Scattering*), espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS, do inglês *Small Angle Neutron Scattering*), espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *Dinamic Light Scattering*), ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*) e microscopia de transmissão de elétrons (TEM, do inglês *Transmission Electron Microscopy*). Essas técnicas fornecem informações sobre o núcleo e a estrutura da monocamada de surfactante ou surfactante/co-surfactante na interface das fases, distribuição de tamanho das partículas dispersas, polidispersão, agregados de gotículas e suas dinâmicas de difusão, bem como sobre a taxa de troca inter-gotículas e fluidez da monocamada.

Ainda outros métodos, *e.g.* medidas de condutividade, viscosidade, coeficiente de difusão, tensão interfacial, permissividade dielétrica e turbidez, são utilizados para que se tenha uma melhor compreensão das propriedades condutoras, bem como de reações químicas e processos de transferência de massa que ocorrem nas microemulsões.<sup>73-75</sup>

#### **2.4.3 Microemulsões Livres de Surfactante**

As microemulsões, sejam elas do tipo água em óleo (ME A/O), óleo em água (ME O/A) ou bicontínuas (ME BC), têm sido largamente estudadas nos últimos anos, pois além de diminuir custos e consumo de solventes orgânicos, possibilitam medidas eletroquímicas, já que aumentam a condutividade do meio e diminuem a viscosidade, o que causa um decréscimo na resistência elétrica da solução.<sup>68,76</sup> Uma representação simplificada das gotículas de microemulsões água em óleo e óleo em água é mostrada na Figura 8.



**Figura 8.** Representação esquemática: (A) Microemulsão água em óleo, (B) Microemulsão óleo em água (adaptado).<sup>73</sup>

No entanto, as microemulsões podem ser formadas também na ausência de surfactantes tradicionais pela mistura de óleo, água e um "anfi-solvente". Nesse caso, são chamadas "microemulsões livres de surfactantes" (SFMEs). Estudos eletroquímicos em microemulsões tradicionais, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, mostraram que o surfactante presente na microemulsão pode ser adsorvido na superfície do eletrodo de trabalho,<sup>77</sup> causando um decréscimo na corrente faradaica, razão pela qual foram iniciados testes em microemulsões na ausência de surfactante.

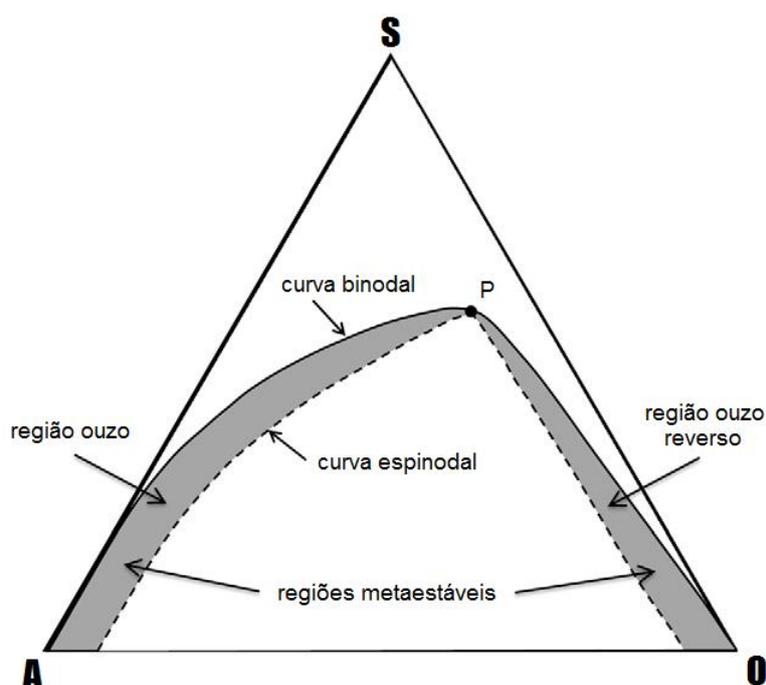
As SFMEs são compostas apenas pelas fases aquosa e oleosa e um co-surfactante, também chamado de anfi-solvente. Hou *et al*<sup>78</sup> descrevem o anfi-solvente como sendo um solvente completa ou parcialmente miscível com ambas as fases aquosa e oleosa.

Smith *et al*<sup>79</sup> relataram, pela primeira vez, em 1977, uma SFME do tipo água em óleo (A/O) composta de água, hexano e *n*-propanol, sistema que foi considerado então como livre de surfactante, uma vez que nenhum surfactante tradicional foi empregado. Mesmo sem a presença do surfactante, descobriu-se que as propriedades físico-químicas do novo sistema eram muito similares às observadas para uma microemulsão tradicional.<sup>78,80</sup> A formação de SFMEs foi posteriormente confirmada em muitos sistemas ternários livres de surfactantes, e as estruturas O/A e BC, semelhantes às aquelas em MEs tradicionais, foram identificadas. Apesar disso, levou-se algum tempo para caracterizar esse novo sistema e compreender sua estrutura interna, empregando técnicas de SAXS, SANS e DLS para este fim.

#### 2.4.3.1 Formação de Microemulsões Livres de Surfactante

As SFMEs são constituídas de três componentes: componente A (água), miscível com o componente B (um hidrótopo, composto químico que tem a propriedade de aumentar a solubilidade em água de várias substâncias orgânicas<sup>81</sup> pouco solúveis neste meio, *e.g.*

*n*-propanol) mas imiscível com o componente hidrofóbico C (*e.g.* biodiesel), o qual, por sua vez, é miscível com o componente B. Nesse tipo de sistema, emulsões estáveis são formadas na região bifásica, como por exemplo, ao se adicionar uma quantidade suficiente de água em uma mistura de *n*-propanol e biodiesel; esse fenômeno é conhecido como o “efeito ouzo”.<sup>82</sup> Vitale e Katz<sup>83</sup> nomearam de “efeito ouzo” a emulsificação espontânea produzida quando uma solução de óleo dissolvido em um solvente atinge a região metaestável, entre as curvas binodal e espinodal, por meio da adição de água. O termo ouzo foi escolhido em homenagem à bebida grega aromatizada com anis, a qual é produto de uma emulsificação espontânea de anetol quando um excesso de água é adicionado a uma solução homogênea concentrada contendo água, etanol e anetol. Ainda de acordo com Vitale e Katz, em ambos sistemas água em óleo e óleo em água, gotículas uniformes podem ser geradas tanto na região ouzo como na região ouzo reverso (ver Figura 9); além disso, o tamanho de tais gotículas pode ser controlado ao variar a quantidade dos componentes e temperatura.



**Figura 9.** Representação esquemática de um diagrama de fases ternário de um sistema genérico composto por água (A), óleo (O) e co-surfactante (S) (adaptado).<sup>84</sup>

De acordo com Klossek *et al.*,<sup>85</sup> resultados de espalhamento e simulação de dinâmica molecular revelaram um detalhe interessante sobre as SFMEs: agregados bem definidos em escala nanométrica já são observados na região monofásica, fato esse que foi chamado de “efeito pré-ouzo”, evidenciando sua ocorrência antes que quantidades suficientes de água

fossem adicionadas ao sistema. Misturas ternárias na região pré-ouzo mostraram ser transparentes, homogêneas e estáveis termodinamicamente, como o são as microemulsões clássicas. Os agregados também apresentam estruturas similares às existentes nas microemulsões com surfactante, sendo formados nos três tipos de microemulsões conhecidas, dependendo da natureza dos componentes e composição do sistema. Assim sendo, as SFMEs mostraram ser uma alternativa promissora para as microemulsões convencionais.<sup>82</sup>

Como consequência, as SFMEs atraíram a atenção de diversos grupos de pesquisa e foram empregadas com êxito para os mais diversos usos, *e.g.* reações químicas, separações, síntese de nanomateriais e liberação de fármacos.<sup>86-89</sup> Kayali *et al*<sup>90</sup> relataram recentemente o uso de uma SFME composta de *n*-propanol, água e um óleo (esse podendo ser biodiesel, limoneno ou Diesel) como combustível alternativo para motores de combustão; ainda em 2008, Balat *et al*<sup>39</sup> também citaram o uso de microemulsões, no entanto, tradicionais, como possíveis combustíveis alternativos. Por outro lado, Bora *et al*<sup>91</sup> publicaram um estudo empregando ácidos graxos como surfactantes não-iônicos em uma microemulsão composta de biocombustíveis derivados de óleo da semente de *Thevetia peruviana* (popularmente conhecida como chapéu-de-napoleão) que evidencia a formação de microemulsões sem a adição de surfactantes.

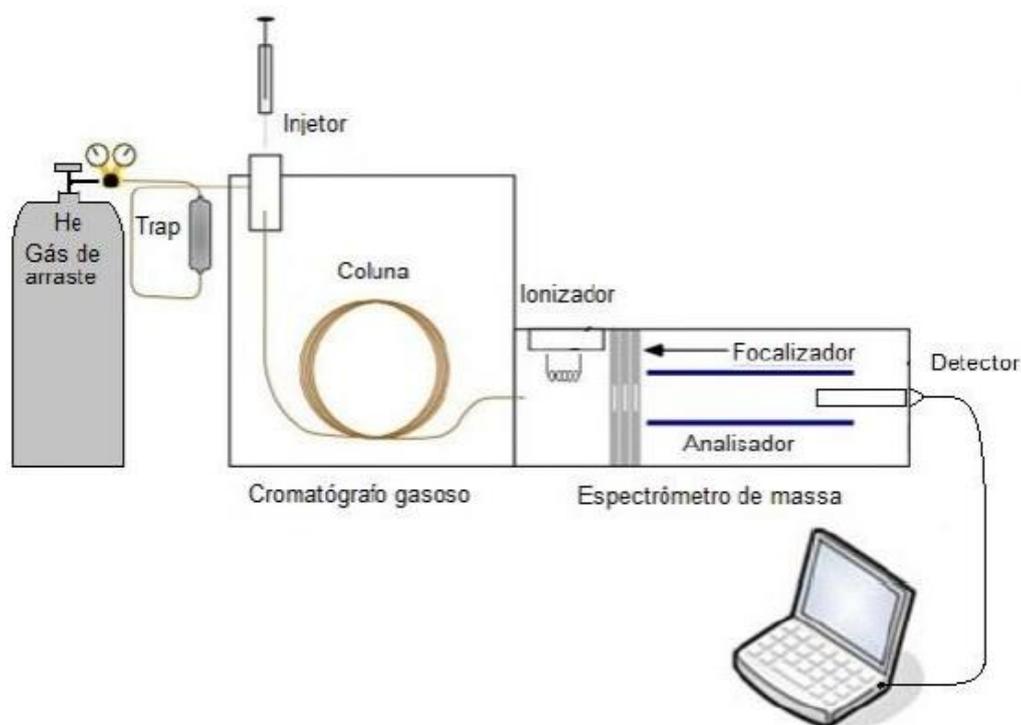
A literatura reporta poucos estudos envolvendo SFMEs em comparação com as microemulsões tradicionais, o que, de acordo com Hou *et al*,<sup>78</sup> deve-se à crença errônea da necessidade da presença de um surfactante para a formação da solução microemulsionada; entretanto, como acima mencionado, as SFMEs apresentam tanto potencial quanto uma microemulsão tradicional.

## 2.5 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

A cromatografia, em todas as suas variantes, é um método de separação de componentes de uma dada mistura, o qual depende da interação das moléculas entre duas fases, chamadas de fase estacionária e fase móvel. A fase móvel pode ser um gás, líquido ou ainda um fluido supercrítico, enquanto a fase estacionária consiste de uma coluna preenchida com pequenas partículas porosas esféricas ou por um líquido imiscível com a fase móvel; essa percorre a fase estacionária promovendo a separação dos compostos da mistura por meio de interações químicas ou físicas. As técnicas cromatográficas são classificadas de acordo com a natureza de ambas as fases e os mecanismos de separação.<sup>92</sup>

## 2.5.1 Cromatografia em Fase Gasosa

A cromatografia em fase gasosa (GC) possibilita a análise de compostos voláteis a partir da interação dos analitos com a fase estacionária e sua identificação e quantificação por meio de um sistema de detecção, oferecendo alta resolução e boa repetibilidade nas análises. Em GC, um gás inerte compõe a fase móvel, chamado de gás de arraste, e a fase estacionária pode ser um líquido ou um sólido. Dentre os vários modos de GC, a técnica de GC/MS (acoplamento com espectrometria de massas) é amplamente empregada para identificar e quantificar componentes em óleos e gorduras, sendo um método confiável, rápido e de fácil manuseio.<sup>93</sup> O acoplamento com espectrometria de massas permite a obtenção de resultados mais confiáveis, possibilitando a análise de biodiesel e óleos comestíveis. Etapas de extração ou pré-concentração das amostras<sup>25,26,94-96</sup> são frequentemente utilizadas, além de processos de derivatização, cuja finalidade é aumentar a sensibilidade na análise por GC.<sup>97,98</sup> A Figura 10 mostra a representação esquemática de um sistema GC/qMS.



**Figura 10.** Representação esquemática de um sistema GC com detector de espectrometria de massas do tipo quadrupolar (qMS).<sup>99</sup>

## 2.5.2 Cromatografia em Fase Líquida: HPLC e UHPLC

Na cromatografia em fase líquida (LC), a fase móvel consiste em um líquido que escoar, em uma direção definida, ao longo da fase estacionária. Os analitos que interagem mais fortemente com a fase estacionária apresentam um tempo de eluição maior, enquanto que os que interagem mais fracamente com a fase estacionária apresentam um menor tempo de eluição.

A HPLC é uma extensão da LC clássica, revelando-se ao longo dos anos como um dos mais eficientes métodos cromatográficos, devido à utilização de altas pressões e de fases estacionárias constituídas por micro-partículas (3 - 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro), possibilitando elevada eficiência na separação.<sup>92</sup>

Existem dois modos principais de operação em HPLC: a fase normal e a fase reversa. Na fase normal utiliza-se uma fase estacionária polar (normalmente sílica) para retenção dos analitos polares, enquanto que na fase reversa a separação é baseada nas forças de atração entre os solutos apolares e os grupos funcionais também apolares ligados a um suporte de sílica.

Assim como a GC, a técnica de HPLC também é bastante utilizada na análise de diferentes ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs, do inglês *fatty acid methyl esters*) do biodiesel,<sup>23,61,100,101</sup> os quais podem ser adequadamente separados, *e.g.* sob eluição em HPLC de fase reversa com identificação por MS.<sup>102</sup>

A cromatografia em fase líquida de ultra alta pressão (ou cromatografia em fase líquida de ultra alta performance) (UHPLC, do inglês *Ultra High Pressure Liquid Chromatography*) é uma técnica avançada de LC na qual são empregadas altas pressões na fase móvel e que tem atraído cada vez mais atenção devido a sua alta resolução. Essa técnica se baseia nos princípios de HPLC, mas com algumas diferenças que permitem uma maior eficiência na separação. As colunas empregadas nas análises possuem comprimento reduzido, assim como as partículas que compõem a fase estacionária, de diâmetro inferior a 2  $\mu\text{m}$ . A aplicação de pressões mais elevadas faz com que o consumo de solventes seja relativamente inferior em relação à HPLC, além do fluxo aplicado para a passagem das amostras pela fase estacionária poder ser mais elevado.<sup>103</sup>

Partículas porosas com diâmetro menor de 2  $\mu\text{m}$  são o coração da UHPLC, e a utilização de tais colunas cromatográficas garantem a melhora na resolução, a diminuição dos tempos de retenção e o aumento na sensibilidade, além de menor consumo de solvente, sem comprometer a análise. O acoplamento com MS ou MS/MS possibilita detecção mais rápida e

mais sensível.<sup>104,105</sup> Pyszynska *et al*<sup>106</sup> reportam o uso dessa técnica na análise de compostos fenólicos, em sua maior parte em alimentos e bebidas. Mahmoodani *et al*<sup>107</sup> descrevem estudos recentes da vitamina D3 por meio de UHPLC-MS/MS.

## 2.6 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

As técnicas eletroanalíticas encontram vasta aplicação em campos tão distintos como química ambiental,<sup>108</sup> bioquímica,<sup>109</sup> biologia molecular<sup>110</sup> e físico-química<sup>111</sup> visando tanto o estudo de propriedades de certas substâncias como sua quantificação. Tais estudos são feitos a partir de medidas de parâmetros elétricos como corrente, potencial, carga, condutividade, entre outros, os quais estão relacionados com a concentração do analito por modelos matemáticos bem estabelecidos. Uma importante característica dessas técnicas, e também grande vantagem, é a possibilidade de se realizar medidas diretamente na amostra, sem a necessidade de etapas como a extração, o que lhes confere baixo custo e diminuição do tempo de análise. Outro ponto a ser considerado é a baixa sensibilidade a interferentes, ampliando sua utilização.<sup>112</sup>

A aplicação de técnicas eletroanalíticas diretamente na amostra de biodiesel é dificultada pela alta resistência elétrica, elevada viscosidade e baixa condutividade elétrica do meio. Em consequência, a realização de medidas eletroquímicas requer a diluição da amostra em um meio adequado, seja ele um solvente ou uma microemulsão.

### 2.6.1 Ultramicroeletrodos

A partir da década de 1960, a crescente utilização de métodos eletroquímicos em estudos de amostras biológicas acelerou o desenvolvimento de eletrodos cada vez menores com a finalidade de realizar análises *in vivo*.

Os primeiros trabalhos empregando os chamados ultramicroeletrodos (ume), *i.e.* eletrodos que possuem ao menos uma de suas dimensões menor do que 25  $\mu\text{m}$ , foram feitos no final da década de 1960 por Fleischmann<sup>113</sup> e colaboradores. Eles apresentam diversas vantagens sobre o uso de eletrodos de dimensões convencionais, tais como:

- i. As taxas de transporte de massa da superfície do eletrodo para o seio da solução e desta para o eletrodo aumentam;
- ii. A capacitância da dupla camada elétrica na camada de difusão diminui;
- iii. Devido à diminuição da corrente, a queda ôhmica diminui.<sup>68,74</sup>

Em consequência, uma grande vantagem dos umes é a possibilidade de realizar experimentos em meios altamente resistivos. Além disso, é possível conduzir experimentos em soluções congeladas e, ainda, em fase gasosa. Por outro lado, sua principal desvantagem é a menor reprodutibilidade em relação a eletrodos convencionais.<sup>113</sup>

Ultramicroeletrodos podem ser construídos com formas diversas, *e.g.* disco, cilindro e hemisfera e em materiais como Au, Pt e C vítreo; exibem altas densidades de corrente, mas o módulo da corrente é pequeno, em geral da ordem do nanoampère, em razão da área de dimensões micrométricas, permitindo que o estado estacionário seja alcançado rapidamente mesmo na ausência de um eletrólito suporte, o que não seria possível com eletrodos de dimensões convencionais.<sup>114</sup>

Como já mencionado anteriormente, a taxa de transporte de massa por difusão para um ume é maior do que a observada para um eletrodo convencional e assim o estado estacionário é atingido mais rapidamente. Isso ocorre devido às pequenas dimensões do ume (o raio de um ume é menor do que espessura da camada de difusão). Por outro lado, a taxa do transporte de massa por convecção, se comparada à por difusão, é negligenciável, permitindo a realização de medidas em fluxo.<sup>74,114</sup>

Sabe-se que, na ausência de uma espécie eletroativa, a célula eletroquímica pode ser comparada a um circuito RC em série, onde R é a resistência da solução e C é a capacitância da dupla camada elétrica. Ao aplicar uma diferença de potencial ( $\Delta E$ ) durante um dado tempo t surge uma corrente capacitiva  $i_C$ , representada pela seguinte equação:

$$i_C = (\Delta E/R) \exp (-t/RC) \quad [1]$$

Caso a solução em estudo contenha uma espécie eletroativa, ter-se-á o aparecimento de uma corrente faradaica  $i_F$ , resultando em uma corrente total  $i_F + i_C$ . Alcançado o estado estacionário,  $i_F$  torna-se diretamente proporcional ao raio de um eletrodo de disco e ao quadrado da corrente capacitiva, *i.e.* em comparação a um eletrodo convencional, a razão ( $i_F/i_C$ ) é maior em um ume, possibilitando a realização de análise de traços e o estudo de reações rápidas.<sup>74</sup>

## 2.6.2 Microeletrodos de Fibra de Carbono

Outro tipo de eletrodo micrométrico empregado em eletroanálise é o de fibra de carbono (CFM, do inglês *carbon fiber microelectrode*). As fibras de carbono são utilizadas

em diversos setores, como a indústria automobilística e materiais esportivos, tendo crescido seu uso em medidas eletroquímicas desde a década de 1980.<sup>115-117</sup>

As características e vantagens sobre os eletrodos convencionais são as mesmas dos umes, ou seja, dimensões da ordem de 100 nm, podendo ser utilizados em microssistemas e também *in vivo*. A fibra de carbono é o material mais empregado para sua fabricação, em razão do baixo custo e alta acessibilidade, sendo os principais materiais precursores o rayon, a poliacrilonitrila e o piche de petróleo.<sup>115,116,118</sup> As propriedades das fibras de carbono, como resistência mecânica, força de tensão e estrutura, dependem do material de origem e do processo de fabricação. Alguns modelos estruturais são apresentados na Figura 11.



**Figura 11.** Modelos estruturais de fibras de carbono (cortes transversais) (adaptado).<sup>115</sup>

As fibras de carbono são classificadas de acordo com o grau de orientação das camadas de grafeno na direção axial das fibras. Sendo assim, as fibras são denominadas de alto, médio e baixo módulo, e classificadas então como tipos I, II e III, respectivamente. As fibras de tipo II são empregadas na fabricação de aviões e carros de corrida, as de tipo III como material de enchimento em plásticos (não apresentam boas propriedades mecânicas) e as de tipo I na indústria automotiva e em pesquisas científicas, especialmente na área de eletroanalítica. Isso se deve ao melhor ordenamento das cadeias de carbono, o que resulta em uma menor resistência elétrica. Devido a suas pequenas dimensões, as fibras de carbono podem ser utilizadas na construção de ultramicroeletrodos; além disso, a presença de grupos funcionais na superfície das fibras permite a fabricação de eletrodos quimicamente modificados e de biossensores.<sup>115</sup>

Jennings<sup>119</sup> e colaboradores foram pioneiros na aplicação analítica das fibras de carbono ao reportar o uso de carbono vítreo e das fibras em titulações coulométricas de iodo. O interesse no emprego desses eletrodos em medidas eletroquímicas cresceu no fim da década de 1970 com a publicação de trabalhos de Armstrong-James e Millar,<sup>120</sup> em 1979, e de Cespuglio e colaboradores,<sup>121</sup> em 1981, ambos em análise de tecido cerebral.

Atualmente, a literatura reporta diversos estudos *in vivo*,<sup>122</sup> em particular em neurociências, na detecção dos mais diversos compostos, *e.g.* dopamina<sup>123-125</sup> e ácido ascórbico.<sup>122</sup> Eles têm sido utilizados também para detecção de metais em sistemas ecológicos e ambientais,<sup>126,127</sup> bem como na determinação de ferro em amostras de vinho.<sup>128</sup> Como dito anteriormente, CFMs encontram aplicação em meios resistivos como o biodiesel; no entanto, de nosso conhecimento, nenhum trabalho nesse sentido se encontra presentemente na literatura.

### 2.6.3 Técnicas Eletroquímicas de Análise

Geralmente, os métodos voltamétricos fazem uso de uma célula eletroquímica, dentro da qual é colocada a solução a ser analisada, associada a três eletrodos: o eletrodo de trabalho, o contra-eletrodo (ou eletrodo auxiliar) e o eletrodo de referência. O eletrodo de trabalho é polarizado por meio da aplicação de uma diferença de potencial entre ele o eletrodo de referência, em um intervalo de tempo constante; a corrente que circula entre o contra-eletrodo e o eletrodo de trabalho é então registrada e o sinal aparece na forma de um voltamograma.

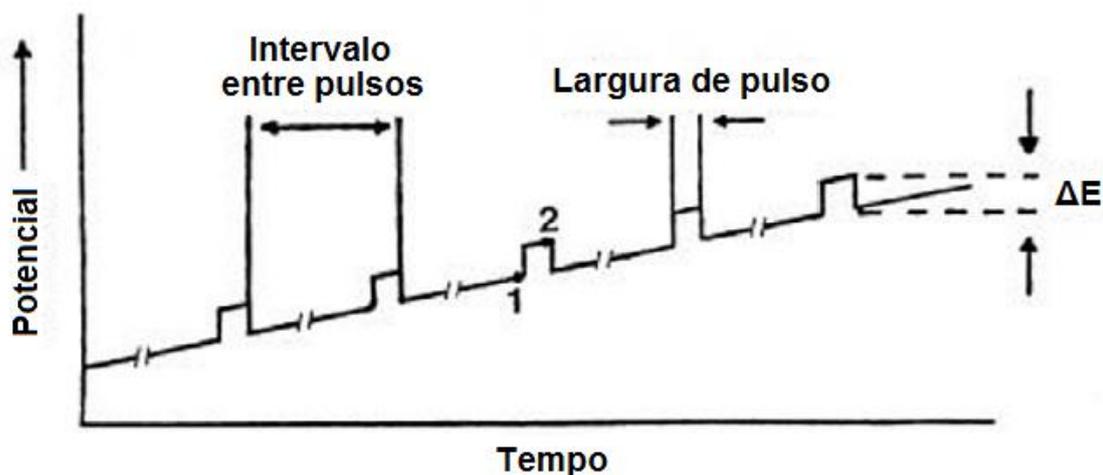
Dentre as diferentes técnicas eletroquímicas existentes, as mais comumente usadas e reportadas são a cronoamperometria e as voltametrias cíclica, de pulso diferencial e de onda quadrada, sendo as duas últimas empregadas no presente estudo por apresentarem melhor sensibilidade em relação a outras técnicas voltamétricas.

#### 2.6.3.1 Voltametria de Pulso Diferencial

A voltametria de pulso diferencial (DPV) é uma técnica que consiste na aplicação de pulsos de igual amplitude (cujos valores podem variar de 10 a 100 mV) sobre uma rampa linear de potencial, medindo-se a corrente antes e depois do pulso aplicado. Tal procedimento permite a compensação da corrente capacitiva, uma vez que seus valores nos dois pontos em que a corrente é amostrada são muito próximos. A primeira corrente é subtraída da segunda e a diferença é plotada *versus* o potencial aplicado, gerando um voltamograma que mostra os picos da corrente, em que a altura de cada pico é diretamente proporcional à concentração do analito e o potencial de pico pode ser empregado para identificar espécies. Devido à compensação da corrente capacitiva ao registrar as diferenças de corrente, a sensibilidade da DPV é significativamente maior, podendo-se obter limites de detecção da ordem de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Além disso, a diferença necessária entre os potenciais de pico para a

determinação simultânea de duas espécies eletroativas pode ser de 50 a 100 mV, ao passo que na voltametria clássica tal diferença deve ser de, ao menos, 200 mV.<sup>129</sup>

A Figura 12 mostra o sinal de excitação potencial  $x$  tempo, em que a corrente é medida antes (em 1) e depois (em 2) da aplicação do pulso.



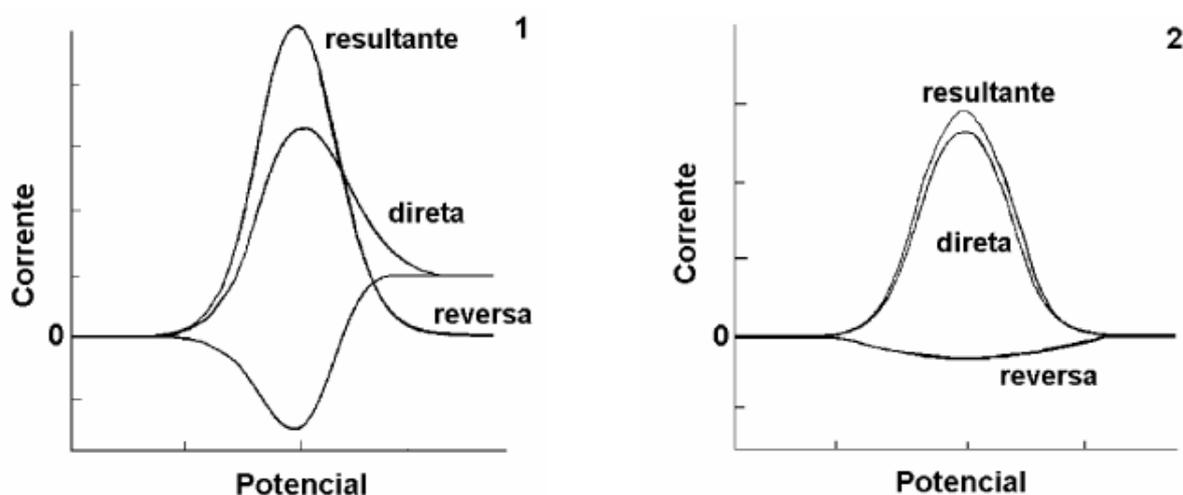
**Figura 12.** Representação do sinal de excitação potencial  $x$  tempo para DPV (adaptado).<sup>129</sup>

### 2.6.3.2 Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV) é uma técnica na qual uma onda composta de uma onda quadrada simétrica, sobreposta sobre uma rampa de potencial em forma de degraus, é aplicada no eletrodo de trabalho, de tal maneira que o pulso direto da onda quadrada coincida com o início do degrau da rampa e o pulso reverso coincida com a metade da etapa da rampa em degraus. A corrente é então medida duas vezes em cada ciclo de onda quadrada, no final do pulso direto e no final do pulso reverso, e a subtração da corrente reversa da corrente direta é então plotada *versus* o potencial aplicado, sendo diretamente proporcional à concentração do analito. Do mesmo modo que em DPV, a técnica de SWV discrimina a corrente capacitiva em razão de sua diminuição mais rápida do que a corrente faradaica, além da amostragem da corrente ser feita perto do final da duração do pulso.<sup>129</sup>

Essa técnica voltamétrica permite que sejam realizados experimentos de forma mais rápida em comparação com DPV, com sensibilidade semelhante ou melhor, pois também ocorre discriminação da corrente capacitiva. Ainda, a SWV é uma técnica que apresenta limites de detecção comparáveis aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas, sendo, junto da DPV, mais sensíveis do que outros métodos voltamétricos.<sup>112</sup>

A Figura 13 mostra os voltamogramas teóricos associados a um sistema reversível e um sistema irreversível, com as correntes direta, reversa e resultante.



**Figura 13.** Representação esquemática dos voltamogramas de onda quadrada: (1) Processo redox de um sistema reversível, (2) Processo redox de um sistema irreversível (adaptado). No exemplo,  $I_{\text{resultante}} = [I_{\text{direta}} - (-I_{\text{reversa}})]$ .<sup>112</sup>

A literatura reporta o uso de diversas técnicas eletroanalíticas na determinação de antioxidantes sintéticos e naturais, *e.g.* voltametria de onda quadrada com eletrodo gotejante de mercúrio em tampão Britton-Robinson e surfactante Triton X-100 e a técnica de voltametria linear com eletrodo de pasta de carbono, no mesmo tampão e em presença de surfactantes.<sup>130,131</sup> Já na determinação simultânea de BHA e TBHQ, foram empregados métodos amperométricos em eletrodo de diamante dopado com boro,<sup>7</sup> de carbono vítreo<sup>132</sup> e em eletrodo impresso de nanotubo de carbono utilizando CTAB.<sup>133</sup> Chýlková *et al*<sup>24</sup> relataram a determinação de BHT empregando eletrodo de ouro em meio isopropanol e Caramit *et al*<sup>134</sup> empregaram eletrodos modificados com nanotubos de carbono na determinação de TBHQ, PG e BHA.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIAIS

As amostras de biodiesel empregadas nos experimentos foram:

- i. Biodiesel de óleo de soja sem adição de antioxidantes sintéticos, cedido por usina do município de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil;
- ii. Biodiesel de óleo residual de fritura (canola e girassol), puro e com adição de BHT entre 600 e 800 mg L<sup>-1</sup>, segundo o fornecedor, cedido por usina do município de Barnawartha, Victoria, Austrália.

Utilizaram-se os seguintes reagentes: diclorometano (DCM) grau GC (Merck KGaA), água deionizada em sistema Milli-Q (Millipore), metanol (SupraSolv), ácido acético (100% v/v) (Sigma Aldrich), fenol (AnalaR, BDH Laboratory Supplies), *p*-xileno (Sigma Aldrich, 99%) e uma mistura de 37 componentes de FAMES (47885-U, Sigma-Aldrich) 10 g L<sup>-1</sup> de concentração total (não individual) diluída a 1 g L<sup>-1</sup> com DCM.

Os antioxidantes usados foram TBHQ (Fluka, ≥ 98%), BHT (Fluka, ≥ 99%), BHA (Sigma-Aldrich, ≥ 98 %) e PG (Sigma-Aldrich, ≥ 98%).

Outros reagentes empregados foram: *n*-propanol (Sigma-Aldrich, ≥ 99,9%), tetrafluoroborato de tetra-*n*-butilamônio (N(Butyl)<sub>4</sub>BF<sub>4</sub>) (Merck, grau síntese), perclorato de tetra-hexilamônio (N(Hex)<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub>) (Acros, 99%), ferroceno (Aldrich, 98%), etanol (Acros, 99%) e água deionizada em sistema Milli-Q (Millipore).

Medidas por voltametria de pulso diferencial (DPV) foram realizadas em célula convencional de três eletrodos empregando, alternativamente, como eletrodo de trabalho, o CFM tipo I (Radiometer) e ultramicroeletrodos de Pt e de Au (EG&G PAR, Princeton Applied Research, Wellesley, MA, USA), ambos com raio de 5 μm, e dois fios de Pt como contra-eletrodo e eletrodo de quasi-referência, respectivamente.

Os experimentos com ume de Pt foram realizados em célula convencional e conduzidos em um potenciostato/galvanostato μAUTOLAB TYPE III. Já as medidas empregando ume de Au e CFM foram realizadas em uma micro célula, utilizando-se um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 30. Os dados foram adquiridos pelo *software* GPES (*General Purpose Electrochemistry Software*) e o tratamento dos voltamogramas obtidos foi feito pelo *software* Origin 8.0<sup>®</sup>.

Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente em gaiola de Faraday, de modo que não houvesse interferências eletromagnéticas nos sinais de corrente elétrica medidos.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Preparo de Amostras e Soluções-Padrão

#### 3.2.1.1 Voltametria de Pulso Diferencial em ume de Pt

O etanol foi utilizado como diluente do biodiesel por ser um solvente de baixa toxicidade e por reduzir custos de análise. Inicialmente, o comportamento eletroquímico dos antioxidantes PG e TBHQ foi investigado em etanol puro contendo  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$  como eletrólito suporte, na faixa de  $10^{-4}$  a  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Uma mistura de biodiesel:etanol na proporção 1:1 (v/v) foi utilizada como meio de estudo em todos os experimentos. Da mesma forma, todas as amostras e soluções-estoque de TBHQ  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  e PG  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  foram preparadas em biodiesel:etanol 1:1 (v/v).

Para a construção das curvas de calibração, foram adicionadas alíquotas das soluções-estoque de TBHQ e PG na célula eletroquímica contendo 10 mL da mistura biodiesel:etanol 1:1 (v/v) e  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$ . Para cada antioxidante foram preparadas amostras para calibração, na faixa de  $1,20 \times 10^{-3}$  a  $8,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para TBHQ e de  $8,60 \times 10^{-4}$  a  $4,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para PG. Foram realizadas medidas por DPV na faixa de potencial de 0,000 a 1,200 V, a uma velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 50 mV e largura de pulso de 50 ms.

A interferência mútua entre TBHQ e PG foi investigada por DPV em ume de Pt, com adições sucessivas de quantidades apropriadas das soluções-estoque dos antioxidantes à solução biodiesel:etanol, empregando os parâmetros de análise acima descritos. Voltamogramas de amostras contendo  $3,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de PG e diferentes concentrações de TBHQ (de  $1,20 \times 10^{-3}$  a  $8,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) foram obtidos; do mesmo modo, a concentração de TBHQ foi fixada em  $4,30 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  variando a concentração de PG (de  $9,30 \times 10^{-4}$  a  $7,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ).

A validação do método foi feita por meio da adição simultânea de quantidades conhecidas de TBHQ e PG à solução de biodiesel:etanol contendo  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ e  $9,40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de PG. Foram feitas dez repetições por DPV para quantificar os

antioxidantes usando o método de adição de padrão. A recuperação foi calculada por deconvolução, por meio da razão entre o valor determinado a partir dos voltamogramas de adição de padrão, obtidos por deconvolução, e o valor de referência, *i.e.* o valor previamente adicionado à amostra.

O *software* Origin 8.0<sup>®</sup> foi empregado no procedimento matemático de deconvolução para a determinação simultânea de TBHQ e PG. Após subtração da corrente de fundo de todos os voltamogramas, aplicou-se a ferramenta *Analysis-Fit Multi-Peaks* para selecionar o número de picos e os potenciais de pico.

Com o intuito de aumentar a reprodutibilidade das medidas, o ume de Pt foi limpo por imersão em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado antes de cada conjunto de experimentos, diariamente, em banho ultrasônico, durante 5 minutos, sendo em seguida enxaguado abundantemente com água Milli-Q. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente e na presença de oxigênio dissolvido.

### **3.2.1.2 Caracterização da SFME**

Inicialmente, foi construído o diagrama de fases ternário partindo-se da SFME em estudo, cuja proporção de biodiesel, *n*-propanol e água Milli-Q era de 18% (m/m), 71% (m/m) e 11% (m/m), respectivamente.

Para as medidas de condutividade, foi preparado um conjunto de SFMEs nos quais o teor de água foi mantido constante em 11%, variando-se os teores de biodiesel e *n*-propanol. Também foi preparado um conjunto de SFMEs nos quais a razão de biodiesel:*n*-propanol ( $R_{B/P}$ ) foi mantida constante em 1:4, variando-se o teor de água. As condutividades foram medidas em um condutímetro Metrohm Conductivity Module 856, com constante de célula 1,02 cm<sup>-1</sup>, a uma temperatura de 25°C.

### **3.2.1.3 Voltametrias de Pulso Diferencial e de Onda Quadrada em CFM**

Nos experimentos empregando o CFM como eletrodo de trabalho foi utilizado como meio solvente uma microemulsão livre de surfactante (SFME) composta de biodiesel, *n*-propanol e água Milli-Q na proporção de 18% (m/m), 71% (m/m) e 11% (m/m), respectivamente. Os antioxidantes BHT e TBHQ foram investigados na SFME contendo 0,02 mol L<sup>-1</sup> de N(Butyl)<sub>4</sub>BF<sub>4</sub> como eletrólito suporte.

As soluções-padrão de TBHQ e BHT foram preparadas individualmente na SFME, sob agitação para melhor dissolver os antioxidantes, na concentração  $1,20 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  cada.

Para os experimentos por DPV, foi empregada a faixa de potencial entre 0,000 e 1,000 V, a uma velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , pulso com 10 mV de amplitude e 50 ms de largura. Já para os experimentos por SWV, a faixa de potencial utilizada foi de 0,000 a 1,300 V a uma frequência de 100 Hz e amplitude de 0,100 V.

### 3.2.1.4 Voltametria de Pulso Diferencial em uma de Au

Utilizou-se como meio solvente a SFME composta de biodiesel, *n*-propanol e água Milli-Q na proporção de 18% (m/m), 71% (m/m) e 11% (m/m), respectivamente. Primeiramente, o comportamento eletroquímico dos antioxidantes TBHQ e BHT foi investigado em *n*-propanol puro contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ , na faixa de concentrações de  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

Neste caso, soluções-estoque de TBHQ e BHT foram preparadas por dissolução dos antioxidantes em *n*-propanol, nas concentrações de  $2,40 \times 10^{-2}$  e  $1,80 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente. Os gráficos de calibração dos antioxidantes foram obtidos por meio da adição de alíquotas adequadas das soluções-estoque à célula eletroquímica contendo 10 mL da SFME e  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ . Um conjunto de amostras foi preparado para cada antioxidante nas faixas de  $1,20 \times 10^{-4}$  a  $2,40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  para TBHQ e de  $9,10 \times 10^{-5}$  a  $3,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  para BHT. Medidas por DPV foram realizadas na faixa de potenciais de 0,000 a 0,850 V, a uma velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms.

A interferência mútua de ambos antioxidantes foi investigada também por DPV, com quantidades apropriadas das soluções-estoque adicionadas sucessivamente à célula eletroquímica contendo 10 mL da SFME, empregando os parâmetros de análise acima descritos. Foram registrados voltamogramas de amostras contendo  $3,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ e diferentes concentrações de BHT (de  $8,75 \times 10^{-5}$  a  $6,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ). Em seguida, a concentração do BHT foi fixada em  $3,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  com variação das concentrações de TBHQ (de  $5,75 \times 10^{-5}$  a  $4,45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ).

A validação do método foi feita por meio da adição simultânea de quantidades conhecidas de TBHQ e BHT à SFME, de  $6,00 \times 10^{-5}$  a  $4,45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e de  $4,55 \times 10^{-5}$  a  $3,35 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente. Foram feitas dez repetições por DPV para quantificar os antioxidantes usando o método de adição de padrão. A recuperação foi calculada por meio da

razão entre o valor determinado a partir dos voltamogramas de adição de padrão, obtidos por deconvolução, e o valor de referência, *i.e.* o valor previamente adicionado à amostra.

O *software* Origin 8.0<sup>®</sup> foi empregado no procedimento matemático de deconvolução para a determinação simultânea de TBHQ e BHT. Após subtração da corrente de fundo de todos os voltamogramas, aplicou-se a ferramenta *Analysis-Fit Multi-Peaks* para selecionar o número de picos e os potenciais de pico.

Com o intuito de aumentar a reprodutibilidade das medidas, o ume de Au era diariamente limpo antes de cada conjunto de experimentos por imersão em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado durante 5 minutos em banho ultrasônico, sendo em seguida enxaguado abundantemente com água Milli-Q. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente e na presença de oxigênio dissolvido.

### 3.2.2 Análises Cromatográficas

#### 3.2.2.1 Análise por GC/qMS

As amostras de biodiesel de óleo residual de fritura puro, comercial (600 - 800 mg L<sup>-1</sup> de BHT, conforme fabricante) e fortificado conjuntamente com BHA, BHT, TBHQ e PG (700 mg L<sup>-1</sup> cada) foram analisadas usando um sistema Agilent 7890A GC-5975C qMS com uma coluna de baixa polaridade Agilent HP-5ms (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm espessura) e injetor convencional *split/splitless*. O padrão interno utilizado foi o fenol.

O programa de temperatura do forno iniciou em 40 °C (por 2 minutos), sendo aquecido até 180 °C a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup> (por 0 minutos) e até 300 °C a uma taxa de 30 °C min<sup>-1</sup> (por 10 minutos). As amostras (1 μL) foram injetadas à 300 °C com *split ratio* (razão da divisão de fluxo) de 1:50 para as amostras de biodiesel e 1:10 para os padrões. O fluxo do gás carreador (He) foi 1,5 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura da fonte de íons foi ajustada em 230 °C e a voltagem da ionização por elétrons foi 70 eV. Os espectros de massa foram adquiridos em uma faixa entre 50 e 450 Da e a identificação dos compostos foi feita por comparação desses espectros com aqueles contidos na biblioteca NIST11.

#### 3.2.2.2 Análise por HPLC-UV

As amostras de biodiesel de óleo residual de fritura puro, comercial (600 - 800 mg L<sup>-1</sup> de BHT, conforme fabricante) e fortificado conjuntamente com BHA, BHT, TBHQ e PG

(700 mg L<sup>-1</sup> cada) foram analisadas a 25 °C em um sistema Agilent 1220 Infinity LC DAD empregando uma coluna de fase reversa C18 (Grace Alltech Alltima 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 µm partícula) ou coluna fenólica Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 µm partícula). Soluções de ácido acético 0,1% (v/v) em água e metanol foram utilizadas como fases móveis A e B, respectivamente. Como padrão interno empregou-se, alternativamente, *p*-xileno e fenol.

Para a coluna C18, o gradiente de eluição iniciou a 50% (v/v) da fase móvel B por 3 minutos aumentando linearmente até 90% (v/v) de B. A porcentagem da fase móvel B foi mantida por 21 minutos, aumentando até 100% (v/v) de B por 6 minutos. A coluna foi mantida em equilíbrio a 50% (v/v) de B por 2 minutos antes da injeção seguinte, resultando em um tempo total de análise de 32 minutos. Alíquotas de 10 µL das amostras foram injetadas em um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>.

Para a coluna fenólica, o gradiente de eluição iniciou em 50% (v/v) da fase móvel B por 17 minutos e então aumentou linearmente para 100% (v/v) de B. A porcentagem da fase móvel B foi mantida por 13 minutos. A coluna foi mantida em equilíbrio a 50% (v/v) de B por 5 minutos antes da injeção seguinte, resultando em um tempo total de análise de 35 minutos. Alíquotas de 5 µL das amostras foram injetadas em um fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup>.

Para todas as análises, as amostras foram diluídas 20 vezes em metanol. Os comprimentos de onda escolhidos foram 254, 260, 270, 280, 285, 290, 295 e 300 nm (comprimento de banda de 2 nm; referência desligado).

Na aquisição e processamento dos dados foi empregado o *software* Agilent MassHunter e em sua visualização foram usados os programas Microsoft Excel 2007 e Origin 8.0<sup>®</sup>. Os componentes do biodiesel foram identificados por comparação de seus espectros de massas com os dos documentos na biblioteca NIST11.

### 3.2.2.3 Análise por UHPLC-ESI-Orbitrap/MS

Soluções padrão preparadas a partir de uma mistura de 37 componentes de FAMES (47885-U, Sigma-Aldrich), 10 g L<sup>-1</sup> de concentração total, diluída a 1 g L<sup>-1</sup> com DCM e amostras de biodiesel de óleo residual de fritura foram analisadas por UHPLC acoplada com um espectrômetro de massas do tipo Orbitrap Q-Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) equipado com fonte de ionização eletrospray aquecida (HESI, do inglês *heated electrospray ionisation source*), bomba binária, autoinjeter e Orbitrap Quadrupolo. Uma coluna fenólica Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 µm partícula) foi

utilizada nas análises. A mesma temperatura e sistema de fase móvel usados nas análises por HPLC-UV foram aqui empregados. O fluxo foi  $0,30 \text{ mL min}^{-1}$  e o volume de injeção  $15 \text{ }\mu\text{L}$ . A fonte HESI foi operada em ambos os modos positivo e negativo. As condições da fonte foram gás de bainha  $35$ , gás auxiliar  $10$ , gás de varredura  $0$ , voltagem do spray  $3,0 \text{ kV}$ , temperatura do capilar  $320 \text{ }^\circ\text{C}$  e temperatura do aquecedor do gás auxiliar  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ . O MS foi operado em ambos os modos positivo e negativo em *full scan* (de  $50$  a  $400 \text{ m/z}$ ) aplicado com as seguintes variações dos parâmetros MS: resolução de  $70\,000 \text{ FWHM}$ , alvo AGC de  $1 \times 10^6$  e tempo máximo de injeção de  $200 \text{ ms}$ . O sistema foi calibrado diariamente, antes das análises, para ambos os modos, positivo e negativo.

Sistemas Agilent OpenLAB CDS (ChemStation Edition) para LC e LC/MS e Microsoft Excel 2007 foram utilizados para visualização de dados. O *software* Xcalibur 3.0.63 (Thermo Fisher) foi empregado para ajustes dos parâmetros de corrida do instrumento e para análise de dados. O *software* Trace Finder 3.0 (ThermoFisher) foi utilizado para identificação, confirmação e quantificação empregando o programa Microsoft Excel 2007.

### 3.2.3 Estudo da Estabilidade do Biodiesel

Um total de  $27$  amostras de biodiesel comercial de óleo residual de fritura ( $600 - 800 \text{ mg L}^{-1}$  de BHT, conforme fabricante) foram expostas, concomitantemente, à temperatura ambiente, ar e luz solar por diferentes períodos, variando de  $0$  a  $8$  semanas (três replicatas para cada semana). O mesmo conjunto também foi preparado tanto para amostras de biodiesel de óleo residual de fritura puro como fortificado com os quatro SPAs testados, com concentração de  $700 \text{ mg L}^{-1}$  cada.

Todas as amostras foram diluídas  $20$  vezes em metanol, de modo a conter entre  $30$  e  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de cada antioxidante, e posteriormente caracterizadas por HPLC-UV. As análises das amostras eram feitas semanalmente, após a coleta de cada conjunto correspondente à semana a ser analisada. O experimentou visou avaliar a degradação dos ésteres do biodiesel na ausência e presença de SPAs, bem como a própria estabilidade dos antioxidantes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS

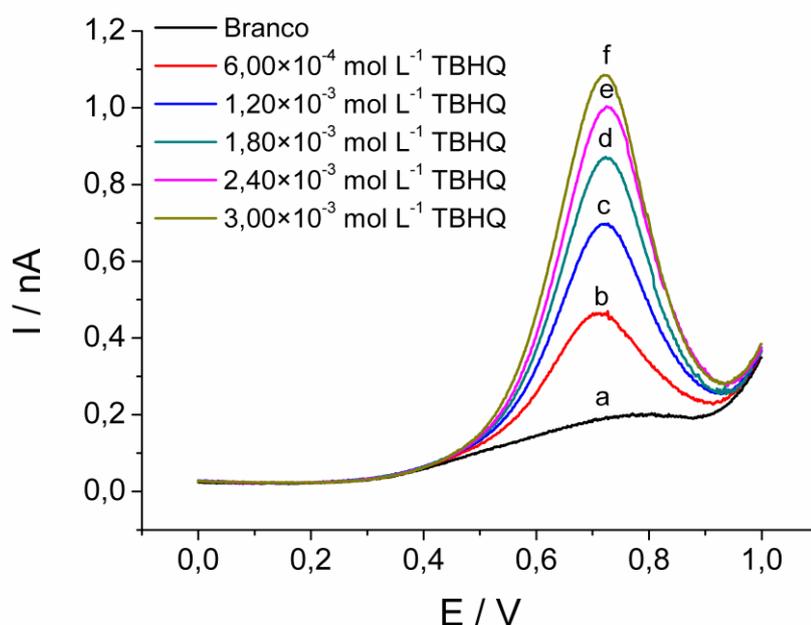
#### 4.1.1 Determinação e Quantificação Simultânea de TBHQ e PG em Meio Etanólico Empregando uma de Pt como Eletrodo de Trabalho

##### 4.1.1.1 Comportamento do Meio Solvente

O etanol é classificado como um solvente prótico, cuja permissividade,  $\epsilon$ , é 24,55 e a viscosidade,  $\eta$ , é 1,078 cP;<sup>135,136</sup> sua oxidação eletroquímica tem sido amplamente investigada nas últimas décadas por meio de eletrodos de Pt em meio aquoso, principalmente por métodos voltamétricos.<sup>137</sup>

Sabe-se que, durante o processo de transferência de elétrons, a interação das moléculas do solvente com espécies eletroativas dissolvidas altera sua capacidade de doar ou receber elétrons. Assim sendo, parâmetros eletroquímicos de um par redox podem ser modificados em função da natureza do solvente.

No presente estudo, experimentos por DPV realizados em etanol puro contendo 0,20 mol L<sup>-1</sup> de N(Hex)<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub> como eletrólito suporte apresentaram uma pequena onda em torno de 0,700 V (mostrada na Figura 14, curva a), provavelmente devido à oxidação do próprio solvente, a qual ocorre em potencial próximo do potencial de oxidação do TBHQ. As curvas b - f da Figura 14 mostram uma relação linear entre a concentração do TBHQ e a corrente.



**Figura 14.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de etanol contendo  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$ : (a) Ausência de TBHQ; (b - f) Presença de concentrações crescentes de TBHQ. Faixa de potencial entre  $0,000 \text{ V}$  e  $1,000 \text{ V}$ , velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de  $10 \text{ mV}$  e largura de pulso de  $50 \text{ ms}$ . Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

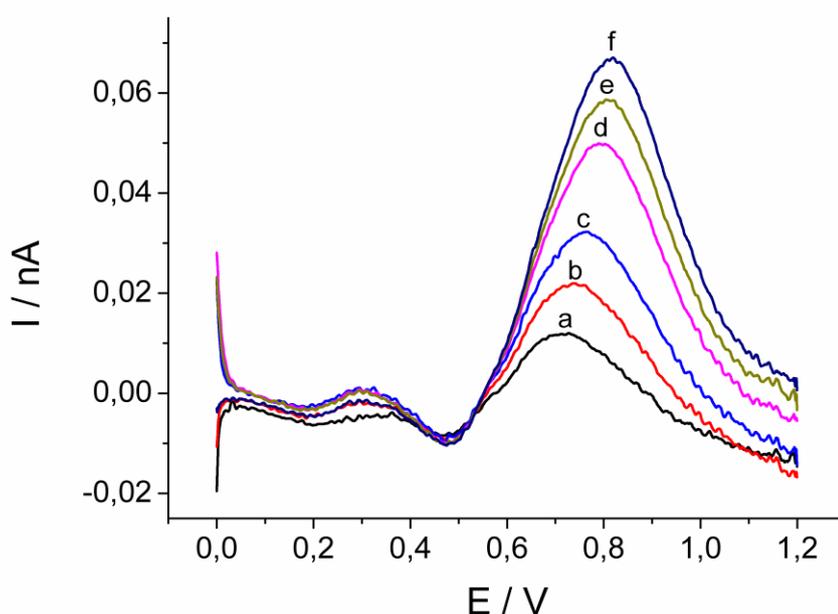
Devido à viscosidade do biodiesel ser mais elevada do que a do etanol, a magnitude do pico da diferencial de corrente de oxidação do TBHQ é cerca de dez vezes menor em meio biodiesel:etanol do que em etanol puro, como observado nos voltamogramas seguintes.

#### 4.1.1.2 Curvas de Calibração para TBHQ e PG

De forma geral, a oxidação de compostos fenólicos dá origem a radicais fenoxil instáveis que, posteriormente, podem ser oxidados a quinonas ou reagir entre si formando dímeros, os quais prontamente se polimerizam em compostos poliaromáticos.<sup>138,139</sup> Além disso, radicais fenoxil são capazes de interagir entre si ou com outros monômeros fenólicos, gerando um filme isolante de forte aderência, que pode passivar a superfície do eletrodo de trabalho.<sup>138,140</sup> No entanto, não foi observada passivação da superfície do eletrodo de Pt nos experimentos realizados no presente estudo. Tal comportamento pode ser atribuído à adsorção de moléculas polares dos ésteres do biodiesel sobre a Pt por meio da porção carbonilo, dificultando assim a deposição de dímeros e polímeros sobre a superfície do eletrodo.<sup>141,142</sup>

Durante experimentos para averiguar a oxidação do PG em microemulsões e em soluções contendo surfactantes, Szymula *et al*<sup>143</sup> observaram que a adição de surfactantes ao sistema influenciava tanto o potencial de oxidação como a corrente de pico. Os filmes de surfactantes aniônicos e não-iônicos formados na interface eletrodo/solução dificultam a transferência de elétrons, diminuindo assim a taxa de transferência de carga na oxidação do PG.

A Figura 15 mostra os voltamogramas obtidos para a oxidação do PG após a subtração da corrente do branco. É possível observar um potencial de pico ( $E_p$ ), de aproximadamente 0,710 V (curva a), o qual é deslocado para potenciais ligeiramente mais positivos com concentrações mais elevadas do antioxidante, comportamento esse atribuído ao caráter irreversível dos processos de oxidação de compostos fenólicos.<sup>144</sup> Ao mesmo tempo, provavelmente ocorre adsorção de moléculas de biodiesel na superfície do eletrodo de trabalho, de modo que a oxidação do PG ocorre em potenciais mais positivos quando em concentrações maiores. O pico visualizado em aproximadamente 0,300 V diz respeito, provavelmente, à oxidação do próprio solvente sobre a Pt.



**Figura 15.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de biodiesel:etanol 1:1 (v/v) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$ : (a - f) Concentrações de PG variando de  $8,60 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  a  $4,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,200 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

A Figura 16 mostra a curva de calibração obtida para o PG, podendo ser vista uma relação linear entre a intensidade de corrente e a concentração do antioxidante na faixa de  $8,60 \times 10^{-4}$  a  $4,90 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>.

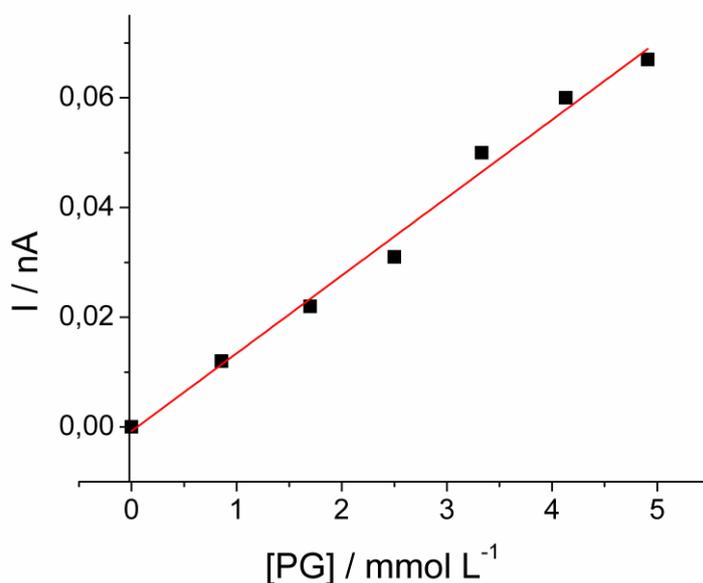
Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados usando as seguintes fórmulas:

$$LD = (3 \times S_b) / b \quad [2]$$

$$LQ = (10 \times S_b) / b \quad [3]$$

em que  $S_b$  é o desvio padrão de dez replicatas do branco e  $b$  é a inclinação da curva analítica.

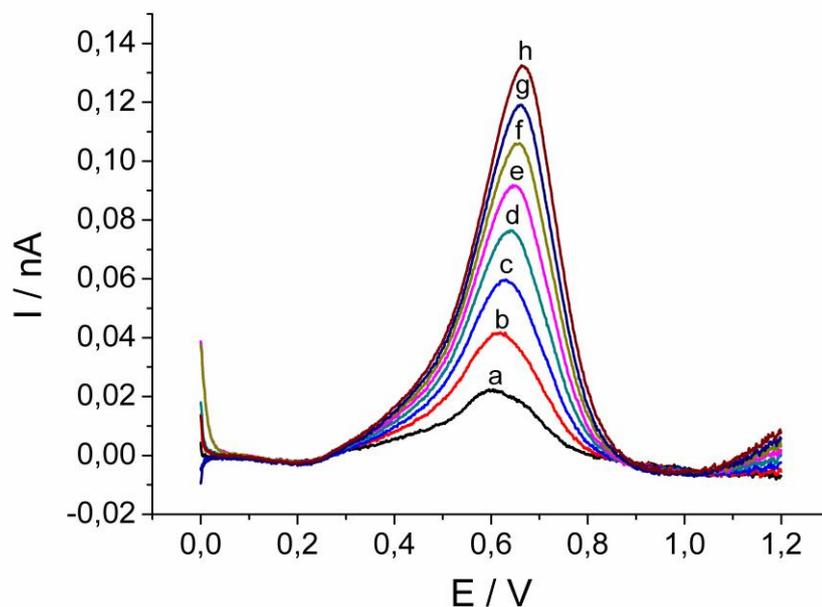
Os valores obtidos para LD e LQ foram  $1,70 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e  $5,70 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente; o valor para a sensibilidade foi  $1,40 \times 10^{-8}$  A L mol<sup>-1</sup> e para o coeficiente de correlação  $r$  foi 0,9930. O pequeno desvio da linearidade para concentrações mais elevadas de PG, observado na Figura 16, já foi previamente reportado na literatura.<sup>145</sup>



**Figura 16.** Curva de calibração para quantificação individual de PG em biodiesel:etanol 1:1 (v/v) de acordo com a Figura 15.

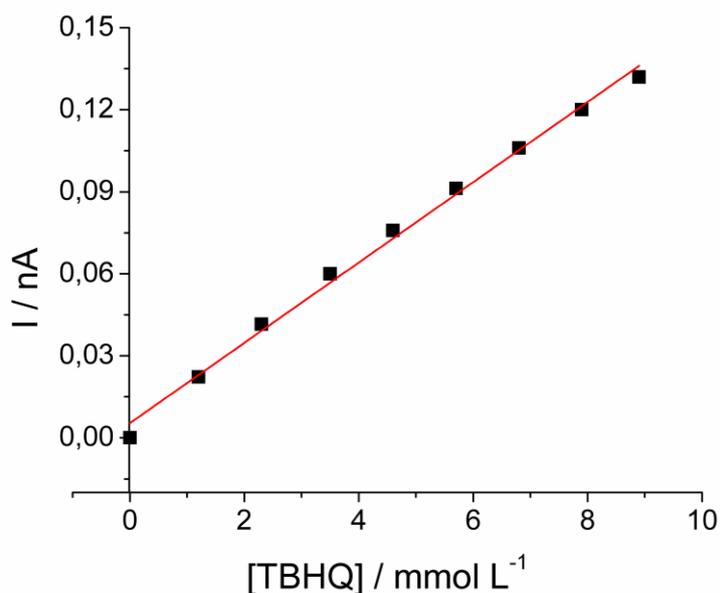
A Figura 17 mostra voltamogramas de pulso diferencial para a quantificação individual do TBHQ após a subtração da corrente do branco. Observa-se um  $E_p$  de 0,600 V, o qual é deslocado para potenciais mais positivos após sucessivas adições do antioxidante,

assim como observado para o  $E_p$  do PG. Com as adições sucessivas de TBHQ, na faixa de  $1,20 \times 10^{-3}$  a  $8,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , ocorre um aumento linear da corrente medida.



**Figura 17.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de biodiesel:etanol 1:1 (v/v) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$ : (a - h) Concentrações de TBHQ variando de  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  a  $8,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,200 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

A Figura 18 mostra a curva de calibração obtida para o TBHQ; nota-se a relação linear entre a intensidade do pico diferencial da corrente e a concentração do antioxidante na faixa de  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  a  $8,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Ambos LD e LQ foram calculados por meio das fórmulas 2 e 3, obtendo-se valores de  $2,10 \times 10^{-4}$  e  $7,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente; a sensibilidade foi  $1,45 \times 10^{-8} \text{ A L mol}^{-1}$  e o coeficiente de correlação  $r$  foi 0,9970.



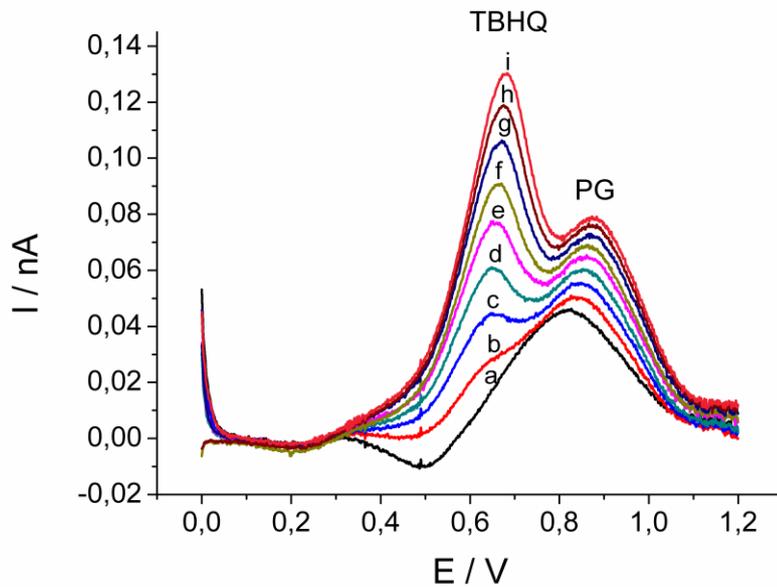
**Figura 18.** Curva de calibração para quantificação individual de TBHQ em biodiesel:etanol 1:1 (v/v) de acordo com a Figura 17.

Ao comparar os voltamogramas apresentados nas Figuras 15 e 17 pode-se observar que o deslocamento do potencial para valores mais positivos com concentrações crescentes de antioxidante é mais significativo para o PG do que para o TBHQ. Esse comportamento é um indício dos diferentes graus de irreversibilidade, bem como da influência da adsorção do biodiesel na superfície do eletrodo, o que dificulta a transferência de elétrons, como já mencionado anteriormente.

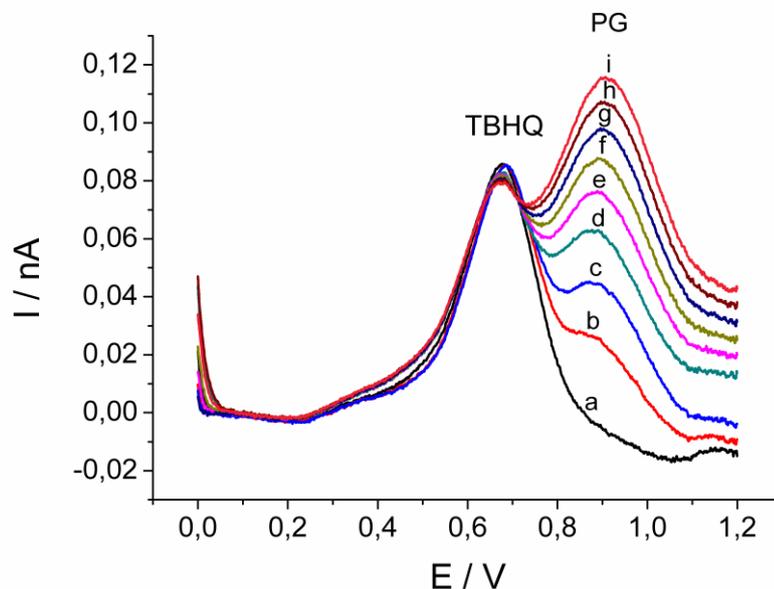
#### 4.1.1.3 Análise da Interferência Mútua entre TBHQ e PG

Com o intuito de avaliar a extensão da interferência mútua entre ambos antioxidantes, foram realizadas varreduras de DPV em amostras contendo tanto  $3,40 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de PG e diferentes concentrações de TBHQ como  $4,30 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de TBHQ e diferentes concentrações de PG.

Após a subtração da corrente do branco, dois picos de oxidação bem definidos foram observados. O TBHQ apresentou um  $E_p$  em aproximadamente 0,630 V, enquanto o PG em cerca de 0,880 V (vistos nas Figuras 19 e 20, respectivamente), resultando em uma separação de 250 mV entre os potenciais, o que possibilita a identificação e quantificação simultânea dos dois antioxidantes em biodiesel.

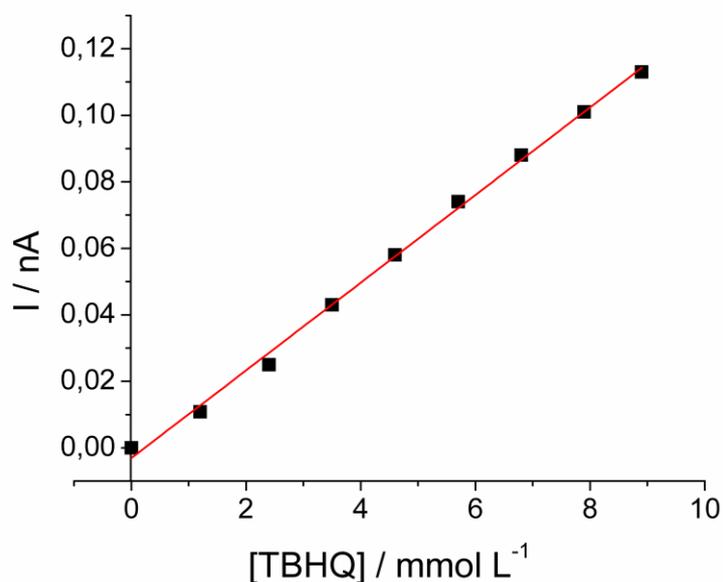


**Figura 19.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de biodiesel:etanol 1:1 (v/v) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$  e  $3,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de PG: (a) Ausência de TBHQ, (b - i) Concentrações de TBHQ de  $1,20 \times 10^{-3}$  a  $8,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,200 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

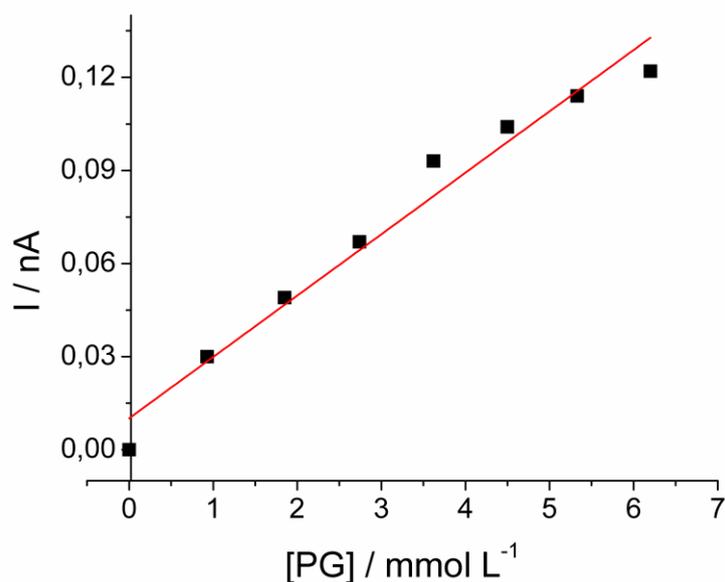


**Figura 20.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de biodiesel:etanol 1:1 (v/v) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$  e  $4,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ: (a) Ausência de PG, (b - i) Concentrações de PG de  $9,3 \times 10^{-4}$  a  $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,200 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

As Figuras 21 e 22 mostram as respectivas curvas de calibração obtidas para TBHQ e PG a partir dos voltamogramas apresentados nas Figuras 19 e 20, respectivamente.



**Figura 21.** Curva de calibração para quantificação individual de TBHQ, em biodiesel:etanol 1:1 (v/v), em presença de  $3,40 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de PG, de acordo com a Figura 19.

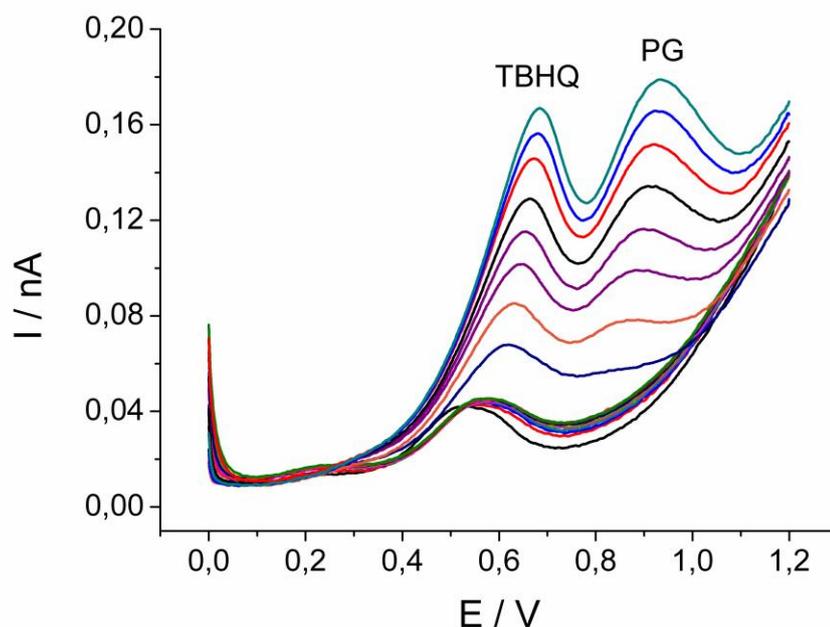


**Figura 22.** Curva de calibração para quantificação individual de PG, em biodiesel:etanol 1:1 (v/v), em presença de  $4,30 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de TBHQ, de acordo com a Figura 20.

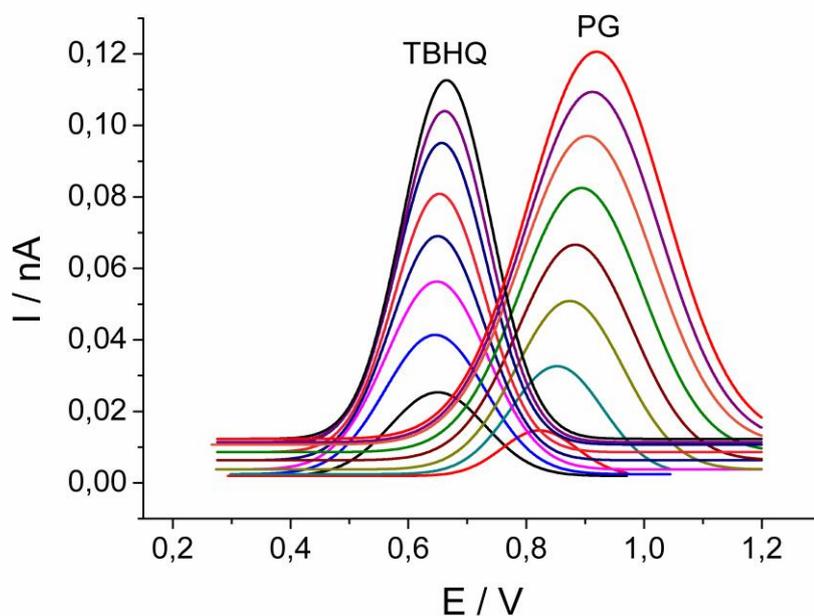
Na presença de TBHQ, a mudança na inclinação da curva de calibração do PG quando este se encontra em concentrações mais elevadas (vista na Figura 22) sugere uma concentração de PG mais baixa na camada de difusão, como evidenciado por um valor menor de corrente comparado com o valor esperado. Uma vez que o correspondente radical catiônico formado pela oxidação do TBHQ é um ácido relativamente forte, um próton será liberado espontaneamente<sup>146</sup> e o radical fenoxil do TBHQ pode ser posteriormente oxidado a fenoxônio. Dessa forma, ambos radicais fenoxil e fenoxônio do TBHQ, os quais são eletrófilos, podem atacar parcialmente o PG, o que pode explicar a interferência entre TBHQ e PG.

#### 4.1.1.4 Quantificação Simultânea de TBHQ e PG

Devido à significativa sobreposição nas correntes de oxidação, a quantificação simultânea de TBHQ e PG em biodiesel, mostrada na Figura 23, requer um tratamento por deconvolução (ver Figura 24), após subtração da linha de base, pois o sinal de fundo da matriz do biodiesel afeta ambos voltamogramas.

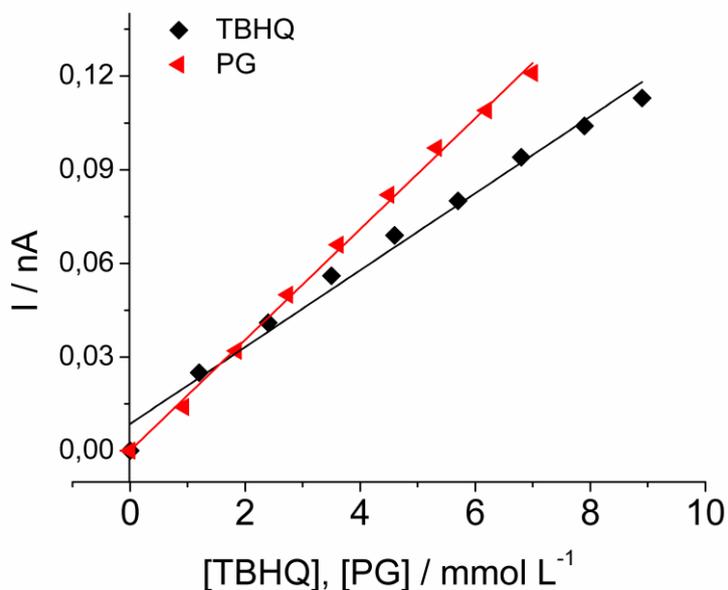


**Figura 23.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de biodiesel:etanol 1:1 (v/v) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$ : Adições sucessivas de TBHQ de  $1,20 \times 10^{-3}$  a  $8,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e de PG de  $9,3 \times 10^{-4}$  a  $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  após obtenção de 10 brancos estáveis. Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,200 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletródo e quasi-referência em Pt.



**Figura 24.** Dados obtidos a partir do procedimento de deconvolução referente aos voltamogramas da Figura 23.

A Figura 25 apresenta as curvas de adição de padrão obtidas a partir dos resultados da deconvolução, para ambos antioxidantes TBHQ e PG.



**Figura 25.** Curvas de adição de padrão para determinação simultânea de TBHQ e PG de acordo com a deconvolução da Figura 24.

Nos experimentos de interferência mútua entre os antioxidantes, os desvios da linearidade em concentrações elevadas são mais significativos para o PG do que para o TBHQ (vistos nas Figuras 19 e 20); já nos experimentos de quantificação simultânea (Figura 23), os desvios mais significativos são referentes ao TBHQ. Tal comportamento pode indicar que, além das reações químicas acima discutidas, um componente cinético, que depende da razão entre as concentrações dos antioxidantes no seio da solução, controla as taxas de oxidação desses compostos.

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 2 abaixo.

**Tabela 2.** Figuras de mérito para determinação de TBHQ e PG em biodiesel:etanol 1:1 v/v.

Analito	Individual		Simultânea		PG fixo <sup>1</sup>	TBHQ fixo <sup>2</sup>
	TBHQ	PG	TBHQ	PG	TBHQ	PG
<b>Intercepto (A)</b>	$5,21 \times 10^{-11}$	$1,71 \times 10^{-13}$	$8,6 \times 10^{-12}$	$3,6 \times 10^{-14}$	$3,89 \times 10^{-11}$	$1,01 \times 10^{-11}$
<b>r</b>	0,9970	0,9930	0,9910	0,9980	0,9980	0,9820
<b>LD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	$2,12 \times 10^{-4}$	$1,70 \times 10^{-4}$	$1,90 \times 10^{-4}$	$1,18 \times 10^{-4}$	$3,64 \times 10^{-4}$	$9,24 \times 10^{-5}$
<b>LQ (mol L<sup>-1</sup>)</b>	$7,00 \times 10^{-4}$	$5,70 \times 10^{-4}$	$5,60 \times 10^{-4}$	$3,90 \times 10^{-4}$	$1,20 \times 10^{-3}$	$3,10 \times 10^{-4}$
<b>Sensibilidade<sup>3</sup></b>	$1,47 \times 10^{-8}$	$1,40 \times 10^{-8}$	$1,23 \times 10^{-8}$	$1,77 \times 10^{-8}$	$1,31 \times 10^{-8}$	$1,98 \times 10^{-8}$

<sup>1</sup> PG fixo em  $3,40 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>

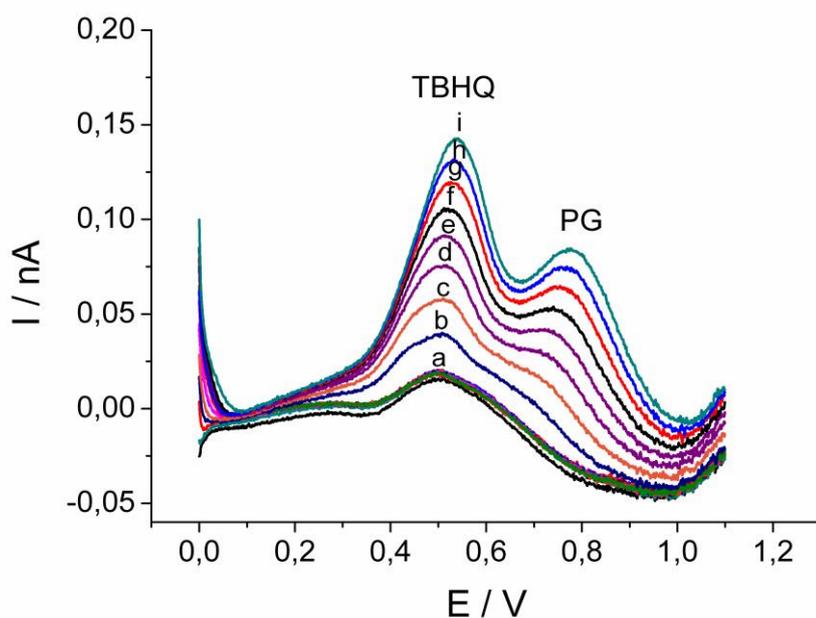
<sup>2</sup> TBHQ fixo em  $4,30 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>

<sup>3</sup> Sensibilidade: A L mol<sup>-1</sup>

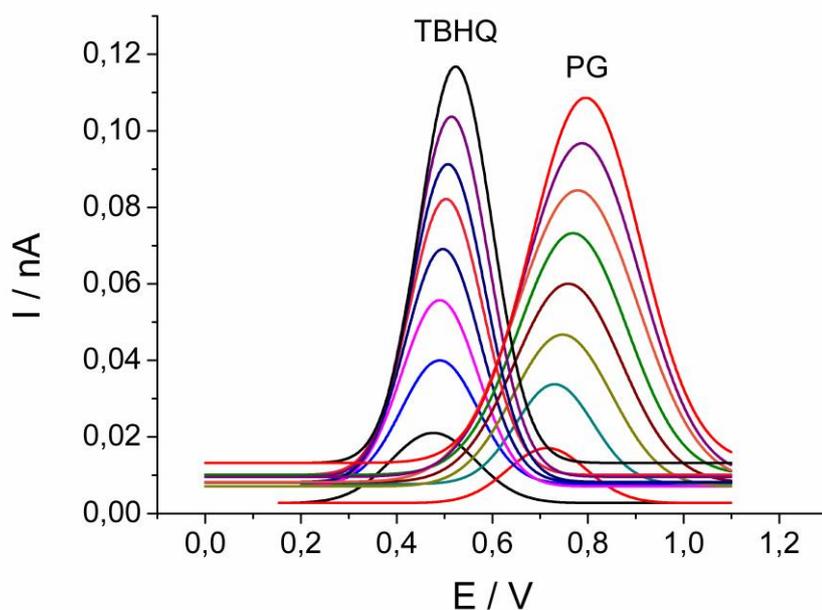
Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que a técnica proposta para a determinação simultânea de TBHQ e PG apresenta elevada sensibilidade analítica e limites de detecção da mesma ordem de grandeza para ambos antioxidantes.

#### 4.1.1.5 Experimentos de Recuperação

Experimentos de recuperação realizados em amostra de biodiesel livre de antioxidantes e fortificada com concentrações variáveis de TBHQ e PG são mostrados na Figura 26. Após subtração da corrente do branco e deconvolução dos respectivos voltamogramas, os picos para ambos antioxidantes são facilmente distinguíveis, como mostra a Figura 27.

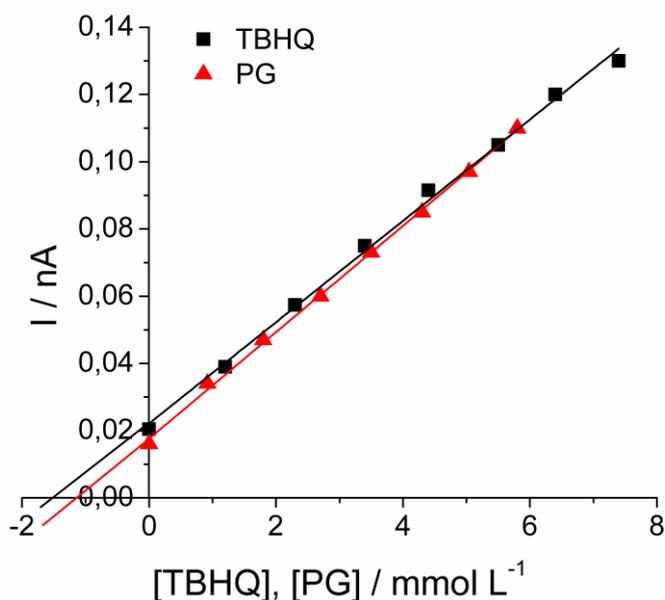


**Figura 26.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Pt ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de biodiesel:etanol 1:1 (v/v) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$ : (a) Amostras de biodiesel fortificadas com  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ e  $9,40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de PG, (b - i) Adições sucessivas de ambos antioxidantes, após obtenção de 10 brancos estáveis. Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,100 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.



**Figura 27.** Dados obtidos a partir do procedimento de deconvolução referente aos voltamogramas da Figura 26.

A Figura 28 apresenta as respectivas curvas de adição de padrão para os antioxidantes TBHQ e PG obtidas a partir do procedimento de deconvolução mostrado na Figura 27.



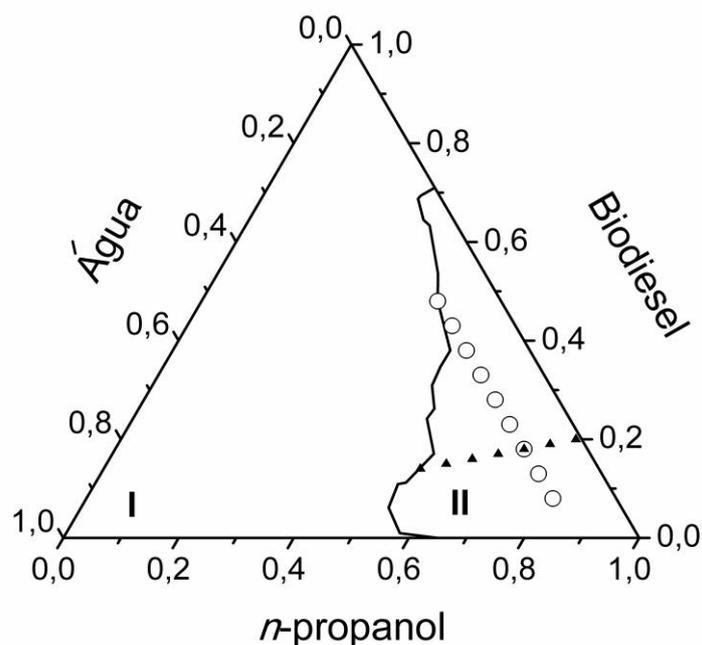
**Figura 28.** Curvas de adição de padrão para determinação simultânea de TBHQ e PG de acordo com a deconvolução da Figura 27.

Foram obtidos valores de recuperação de 116% para TBHQ e 104% para PG, o que indica precisão e exatidão satisfatórias. Desse modo, a técnica proposta pode ser empregada na determinação direta e simultânea de TBHQ e PG em biodiesel sem a necessidade de pré-tratamento das amostras.

#### 4.1.2 Formação e Caracterização de SFME A/O de Biodiesel

Uma solução homogênea e opticamente transparente constituída de água, óleo e um co-surfactante não é indício suficiente de que o sistema formado seja uma microemulsão. A confirmação pode ser feita por meio da construção de um diagrama de fases ternário e de outros parâmetros, tais como propriedades físicas, ópticas e elétricas. Basicamente, um sistema microemulsionado apresenta duas regiões, uma de miscibilidade entre os componentes e outra de imiscibilidade (regiões I e II, respectivamente, na Figura 29).

O diagrama de fases da mistura água, *n*-propanol e biodiesel apresenta estas duas regiões, em que os pontos representados por ○ e ▲ indicam, respectivamente, composições em que o teor de água e a razão biodiesel:*n*-propanol ( $R_{B/P}$ ) são constantes.



**Figura 29.** Diagrama de fases ternário de misturas de biodiesel, água e *n*-propanol (m/m), a 25 °C, em que: (I) Região de imiscibilidade, (II) Região de miscibilidade. A intersecção entre os pontos ○ e ▲ indica a SFME empregada no presente estudo (71% *n*-propanol, 11% água e 18% biodiesel).

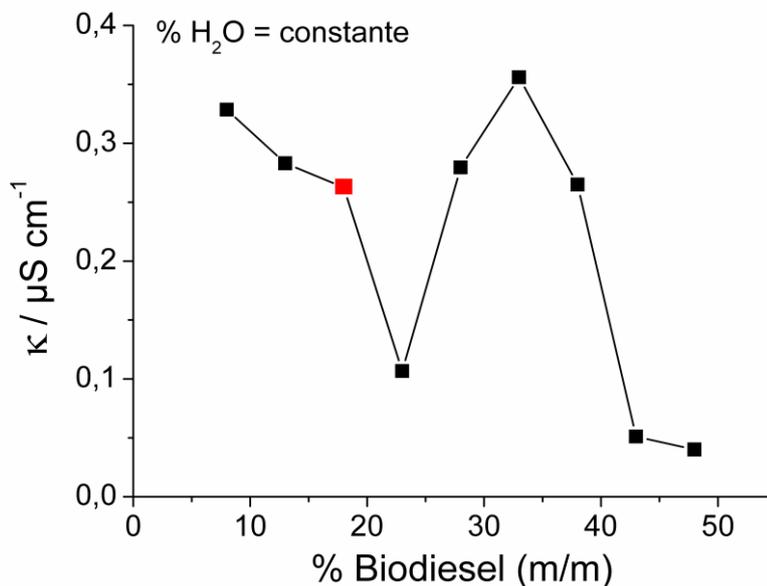
A região de miscibilidade corresponde à microemulsão na qual os componentes formam uma solução isotrópica opticamente transparente; já a região de imiscibilidade diz respeito a soluções multifásicas, *i.e.* microemulsão em equilíbrio com excessos de água ou óleo.

As microemulsões A/O são formadas com baixo teor de água, sendo o óleo a fase contínua. Ao aumentar gradualmente o teor de água, ocorre a transição para um sistema bicontínuo (desde que não haja separação de fases e a solução permaneça isotrópica); por fim, com o teor de água mais alto que o de óleo, tem-se uma microemulsão O/A.

Na microemulsão em estudo (71% *n*-propanol, 11% água e 18% biodiesel (m/m)), o *n*-propanol é o anfolvente, com pKa 19,4 a 25 °C e permissividade 20,1,<sup>147</sup> portanto miscível tanto com o biodiesel quanto com a água. Assim, é possível que uma pequena quantidade de íons H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, resultante do caráter levemente ácido do *n*-propanol, esteja presente nas gotículas de água, cuja superfície estará recoberta por moléculas de *n*-propanol, via ligação hidrogênio da hidroxila do álcool e por moléculas dos ésteres do biodiesel, o qual também estará solvatado por moléculas de *n*-propanol.

O estudo da estrutura das microemulsões pode ser feito por várias técnicas, entre elas medidas do coeficiente de difusão e de condutividade elétrica, sendo essa a mais simples e mais empregada para investigar microestruturas e mudanças estruturais nas microemulsões.<sup>75,148</sup> No presente estudo foram realizadas medidas de condutividade elétrica ( $\kappa$ ) em microemulsões com diferentes composições, primeiramente mantendo o teor de água constante com variação do teor de biodiesel e, posteriormente, fixando a razão de biodiesel:*n*-propanol ( $R_{B/P}$ ) em 1:4 e aumentando gradualmente o teor de água.

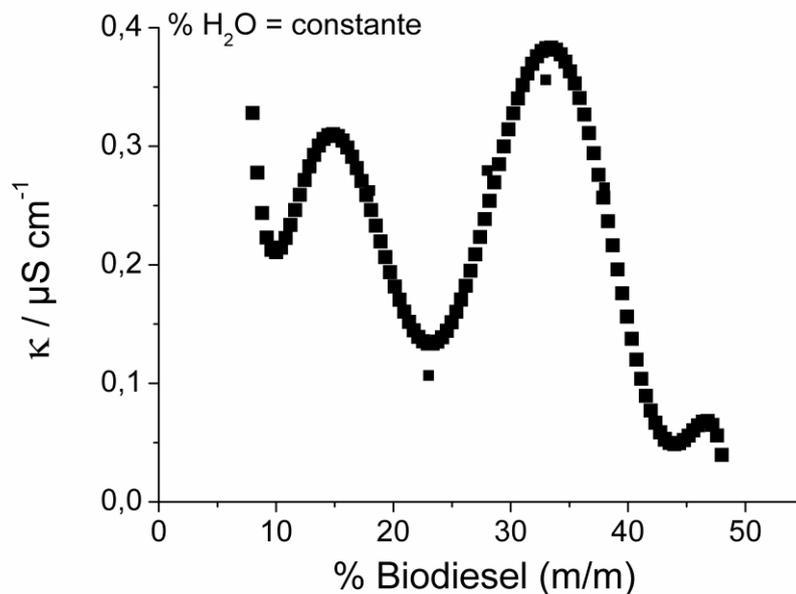
A Figura 30 mostra a variação da condutividade  $\kappa$  em função do teor de biodiesel, mantido constante o teor de água (% m/m), para sistemas com composição correspondente aos pontos representados por  $\circ$  na Figura 29.



**Figura 30.** Variação da condutividade elétrica  $\kappa$  em função do teor de biodiesel (teor de água constante) para os sistemas correspondentes aos pontos representados por  $\circ$  na Figura 29. O ponto assinalado em vermelho representa a SFME usada no estudo.

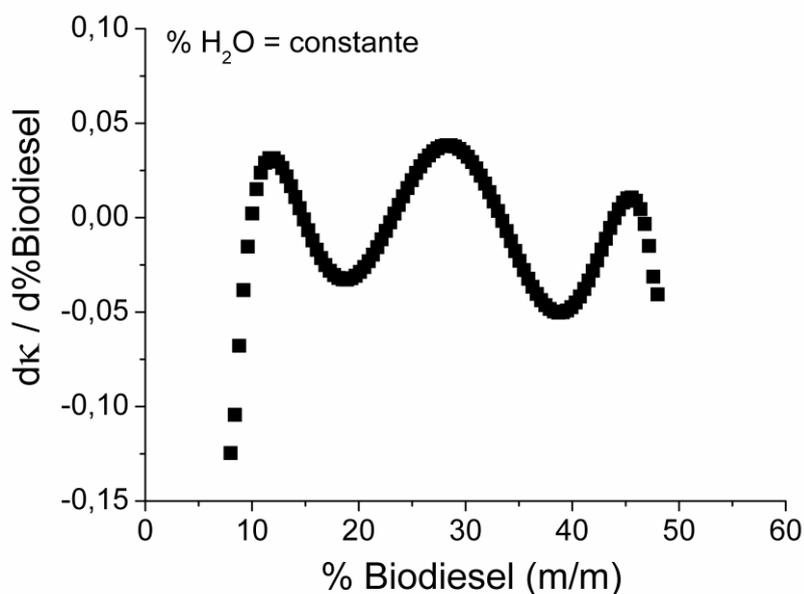
Pode-se observar que o aumento no teor de biodiesel e correspondente diminuição do teor de *n*-propanol causam flutuações nos valores de  $\kappa$ , indicando mudanças na organização estrutural dos sistemas microemulsionados em função da composição que afetam significativamente sua condutividade. Eicke *et al*<sup>148</sup> e Antalek *et al*<sup>149</sup> afirmam que tais sistemas podem apresentar modificação da estrutura e do tamanho das gotículas dispersas no meio contínuo, bem como na percolação entre ambas as fases.

Para melhor compreensão dos sistemas, foi feito um ajuste polinomial dos dados de condutividade seguido da primeira derivada, como mostrado nas Figuras 31 e 32, respectivamente. Os resultados evidenciam que a estruturação das microemulsões muda de acordo com a composição. Considerando que a permissividade da fase contínua diminui com o aumento do teor de biodiesel e que o teor de água é constante, valores máximos e mínimos de  $\kappa$  (Figura 31) indicam, respectivamente, diminuição de tamanho e aumento do número de gotículas de água, e diminuição do número de gotículas com aumento de tamanho. É necessário considerar ainda o aumento da resistência elétrica do meio contínuo com o teor de biodiesel como um fator que muito provavelmente contribuiu para a reorganização estrutural da fase dispersa. Ou seja, o tamanho e a estrutura das gotículas são modificados de modo a adquirir a configuração mais estável em cada composição.



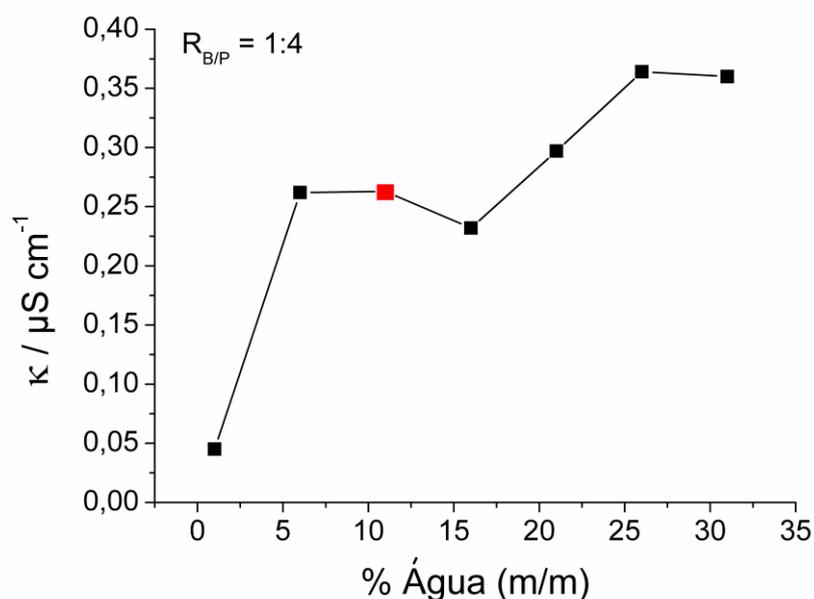
**Figura 31.** Valores de condutividade elétrica  $\kappa$  da Figura 30 ajustados com um polinômio, em função do teor de biodiesel (% m/m). Sistema com composição correspondente aos pontos representados por  $\circ$  na Figura 29.

A derivada da função polinomial da Figura 31 permite visualizar mais claramente pontos de inversão de tamanho/composição das gotículas com o aumento do teor de biodiesel. Neste aspecto, as variações estruturais mais significativas ocorrem para as composições contendo em torno de 12%, 18%, 28%, 38% e 45% de biodiesel.



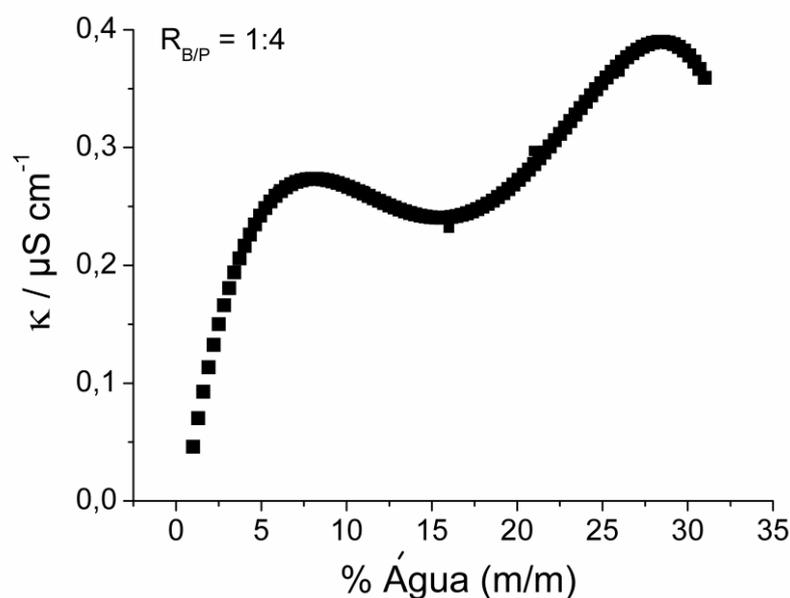
**Figura 32.** Derivada do ajuste polinomial dos valores de condutividade elétrica  $\kappa$  em função do teor de biodiesel (% m/m). Sistema com composição correspondente aos pontos representados por  $\circ$  na Figura 29.

Na Figura 33 é mostrada a variação de  $\kappa$  em função do teor de água ( $R_{B/P}$  constante em 1:4) para os sistemas correspondentes aos pontos representados por  $\blacktriangle$  na Figura 29.

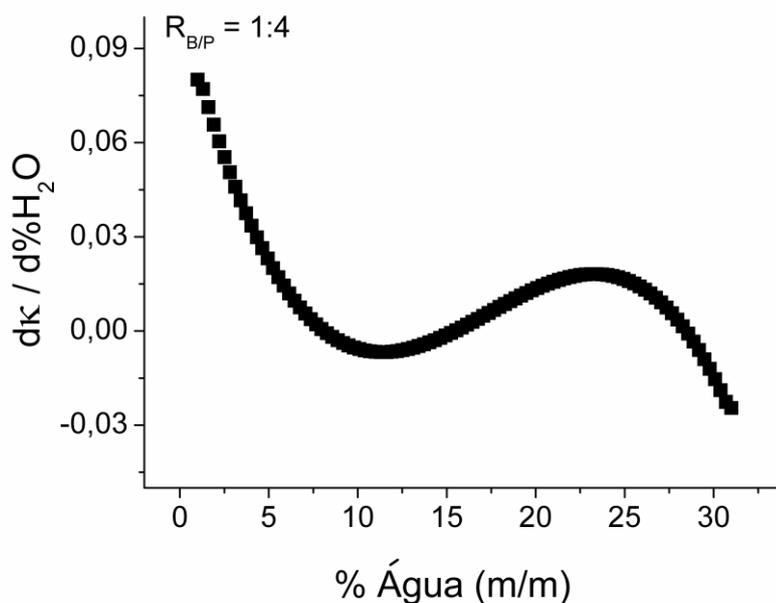


**Figura 33.** Condutividade elétrica  $\kappa$  em função do teor de água ( $R_{B/P}$  constante em 1:4) para os sistemas correspondentes aos pontos representados por  $\blacktriangle$  na Figura 29. O ponto assinalado em vermelho representa a SFME usada no estudo.

Assim como observado na Figura 30, a variação no teor de água provoca flutuações nos valores de  $\kappa$ , ratificando a hipótese de que a composição desses sistemas afeta significativamente os valores de condutividade. Neste caso, o ajuste polinomial e sua derivada (ver Figuras 34 e 35) mostram uma modificação estrutural mais suave do sistema, o que pode estar relacionado tanto com a dificuldade de interação entre as fases aquosa e oleosa, devido à significativa diferença de polaridade relacionada com a formação de ligações hidrogênio *n*-propanol-água, como com o teor crescente de água, cuja elevada condutividade não altera significativamente a condutividade da microemulsão.



**Figura 34.** Ajuste polinomial dos valores de condutividade da Figura 33 em função do teor de água (% , m/m). Sistema com composição correspondente aos pontos representados por  $\blacktriangle$  na Figura 29.



**Figura 35.** Derivada do ajuste polinomial dos valores de condutividade elétrica  $\kappa$  da Figura 33 em função do teor de água (% , m/m). Sistema com composição correspondente aos pontos representados por ▲ na Figura 29.

Além disso, como o teor de água não ultrapassa 35%, a variação da composição não é tão significativa quando comparada à variação no teor de biodiesel.

Xu *et al*<sup>75</sup> estudaram um sistema semelhante e observaram transições de estruturas por meio da variação da condutividade com a composição de um sistema ácido oléico/água/*n*-propanol e razão constante água:*n*-propanol. Os autores atribuíram a estruturação do sistema em microemulsão em razão da fase óleo conter monoésteres de ácidos graxos, favorecendo a formação de microemulsão. Isso porque ésteres de ácidos graxos comportam-se como surfactantes não iônicos,<sup>150,151</sup> ou seja, apresentam em sua estrutura molecular uma cadeia apolar com extremidade polar, o que lhes confere anfifilicidade. Além disso, como já citado<sup>70</sup> anteriormente, álcoois de cadeia média, como o *n*-propanol, diminuem a tensão interfacial, auxiliando a formação de gotículas.

#### 4.1.2.1 Coeficiente de Difusão do Ferroceno em SFME A/O de Biodiesel

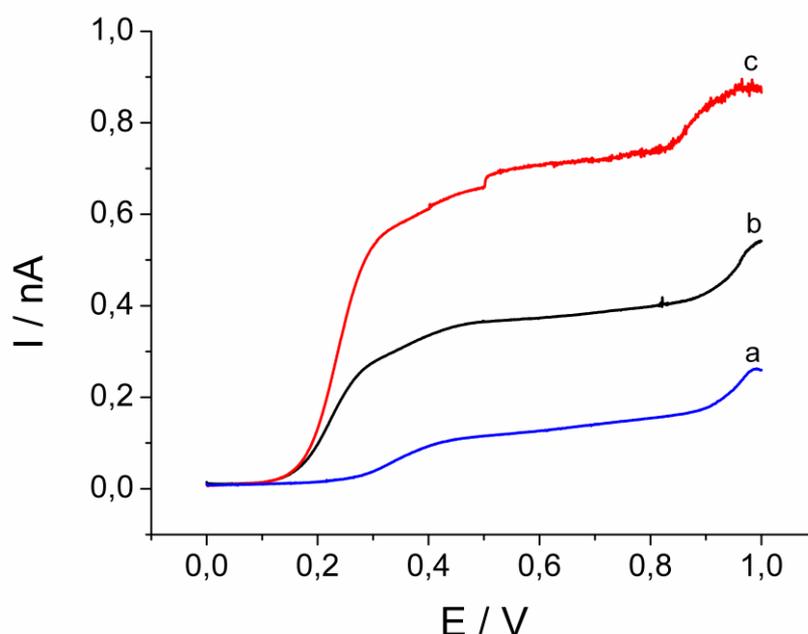
O ferroceno (Fc) é uma sonda recomendada<sup>152</sup> como referência na análise em meios não-aquosos, sendo o sistema redox já bem estabelecido na literatura para diversos meios.<sup>153</sup> Assim sendo, com finalidade de confirmar a estrutura A/O da SFME em estudo, foi

determinado o coeficiente de difusão do Fc ( $D_{Fc}$ ) por voltametria linear (LV, do inglês *Linear Voltammetry*).

Sabe-se que o Fc é oxidado eletroquimicamente a ferricínio ( $Fc^+$ ) conforme a equação 4 e que, apesar da baixa solubilidade em água<sup>153</sup> ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), uma pequena porção da sonda adicionada a uma ME A/O pode se dissolver no interior das gotículas de água:



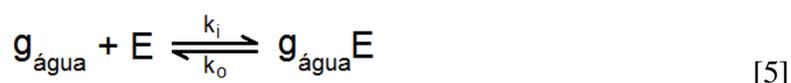
A Figura 36 mostra os voltamogramas obtidos por voltametria linear da SFME em estudo na ausência e presença de Fc.



**Figura 36.** Voltamogramas obtidos por LV em ume de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) em SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $N(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ , sem adição de antioxidantes: (a) Ausência de ferroceno, (b) Presença de  $8,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de ferroceno, (c) Presença de  $1,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de ferroceno. Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,000 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ . Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

Na ausência de Fc (curva a), observa-se uma onda em torno de 0,350 V, valor próximo ao observado para a oxidação de um antioxidante natural já presente no biodiesel (visto na curva b da Figura 42 a seguir). Esse valor é compatível com o obtido por Silva *et al*<sup>77</sup> em

voltametria cíclica para uma microemulsão tradicional. Ao se adicionar Fc na microemulsão, observam-se potenciais de meia-onda em torno de 0,210 V. De acordo com MacKay,<sup>154</sup> uma dada espécie E entra na gotícula de água ( $g_{\text{água}}$ ) da microemulsão com uma taxa  $k_i$  controlada por difusão, conforme equação 5 a seguir, enquanto que a taxa de saída de E da gotícula de água,  $k_o$ , diz respeito à solubilidade de E nas fases dispersa e contínua:



O coeficiente de difusão do Fc,  $D_{\text{Fc}}$ , foi calculado por meio da equação 6 para o ume:

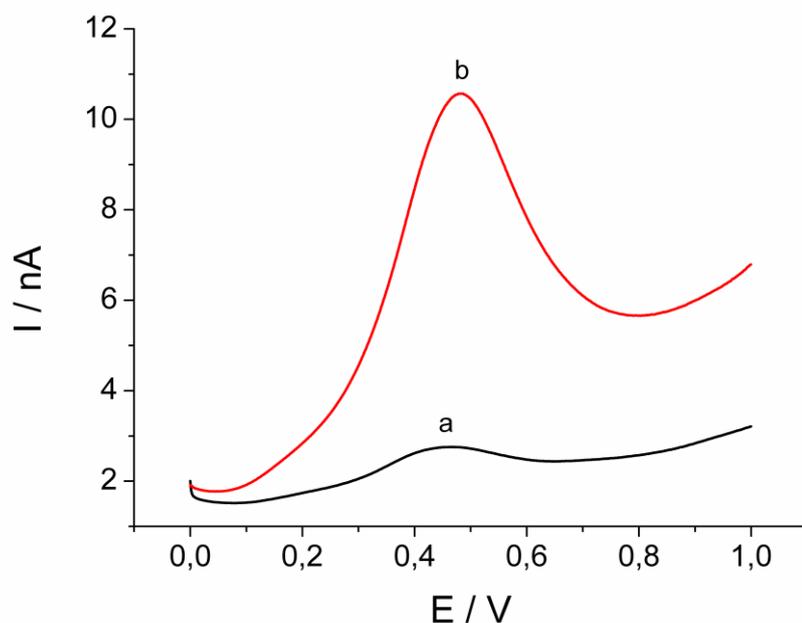
$$I_{\text{lim}} = 4nFrDC \quad [6]$$

em que  $n$  é o número de elétrons,  $F$  é a constante de Faraday,  $r$  é o raio do ume,  $C$  é a concentração de Fc e  $D$  é o coeficiente de difusão.<sup>155</sup>

O valor encontrado para  $D_{\text{Fc}}$  foi de  $2,30 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  ( $I_{\text{lim}} = 3,50 \times 10^{-10} \text{ A}$ ), em concordância com o valor encontrado por Silva *et al*<sup>77</sup> ( $1,40 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) em estudo com microemulsão de biodiesel A/O.

#### **4.1.3 Quantificação Simultânea de TBHQ e BHT em SFME A/O de Biodiesel Empregando CFM como Eletrodo de Trabalho**

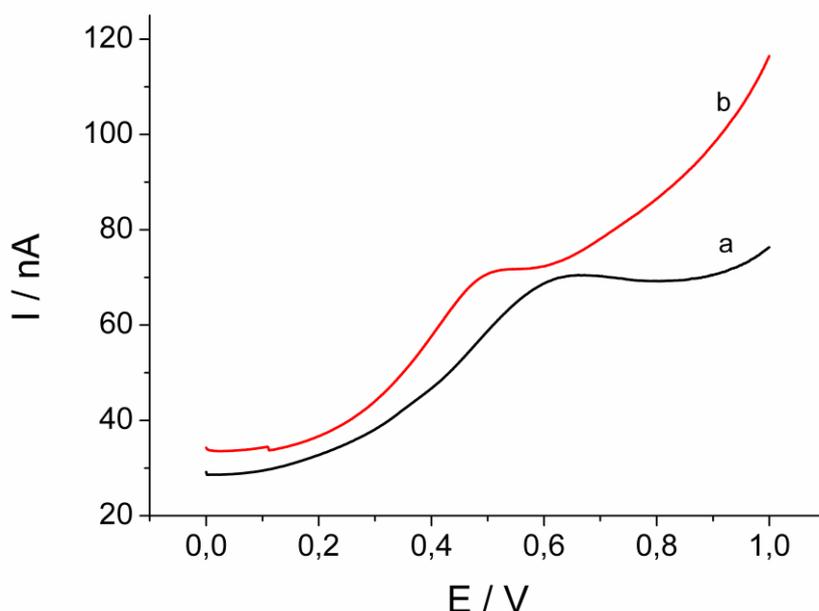
A fim de avaliar a resposta do CFM relativa aos antioxidantes TBHQ e BHT, foram realizadas medidas preliminares por DPV na SFME (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)), na ausência e presença de TBHQ. O resultado é mostrado na Figura 37.



**Figura 37.** Voltamogramas de pulso diferencial em CFM tipo I de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : (a) Ausência de TBHQ, (b) Presença de  $6,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ. Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,000 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

A resposta do CFM ao analito estudado evidencia a elevada sensibilidade desse eletrodo e a possibilidade de usá-lo na detecção de antioxidantes em biodiesel. Entretanto, após varreduras subsequentes observou-se que a corrente medida apresentava valores cada vez menores do que o inicialmente obtido, indicando um possível processo de adsorção na superfície porosa do eletrodo de trabalho.

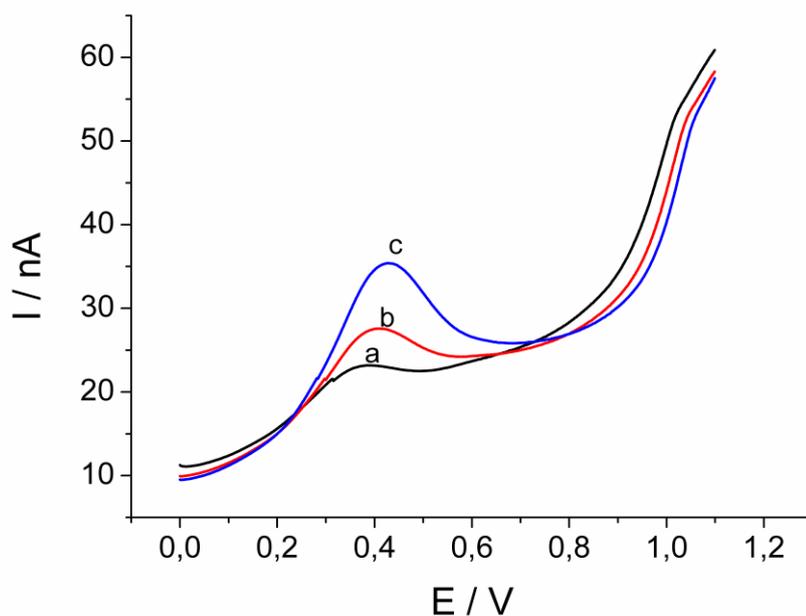
A limpeza do CFM tem grande influência em sua resposta. O fabricante aconselha deixá-lo imerso em solução de  $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$  durante 2 horas e em seguida lavá-lo com água deionizada em abundância. Esse procedimento foi seguido durante algum tempo, ao fim do qual foi possível observar novamente um decréscimo no valor da corrente medida, se comparada com a inicialmente obtida. Tal comportamento, indicativo do processo de adsorção acima mencionado, foi corrigido aplicando ao eletrodo 20 ciclos potenciodinâmicos no meio SFME após a limpeza com  $\text{NaOH}$ . Após esse pré-tratamento foi observado um acréscimo no valor da corrente, bem como o deslocamento do potencial de pico do TBHQ para valores menos positivos, como mostra a Figura 38.



**Figura 38.** Voltamogramas de pulso diferencial em CFM tipo I de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$  na presença de  $6,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ: (a) Sem pré-tratamento, (b) Com pré-tratamento. Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,000 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

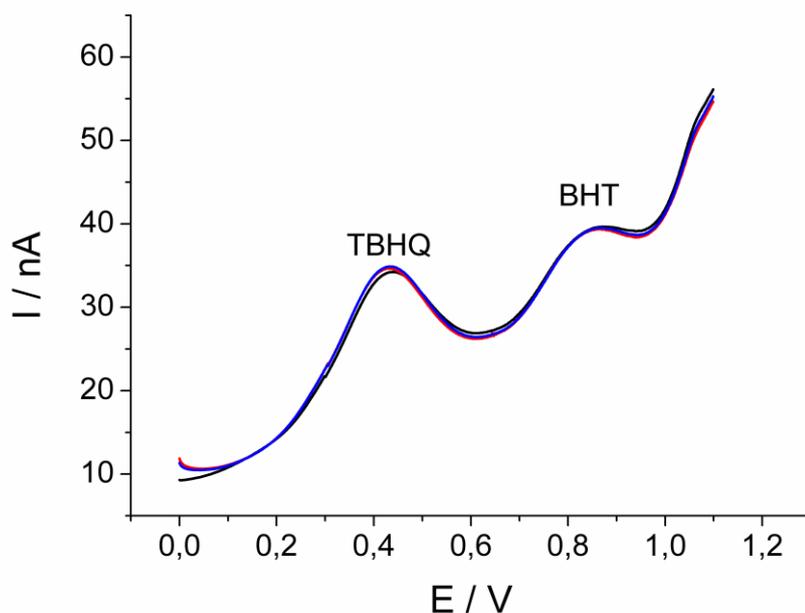
Entretanto, apesar da melhora do sinal e aumento do valor da corrente se comparada com a da Figura 37, o pico que inicialmente era bem definido tornou-se um “ombro”, e, mesmo após sucessivas adições de TBHQ, a resposta permanecia insatisfatória, com apenas pequenos aumentos da corrente após cada adição.

Uma hipótese a ser considerada é a passivação do eletrodo, o qual pode ter camada sobre camada do antioxidante adsorvida em sua superfície, causando assim a diminuição na corrente medida. Dessa forma, a limpeza apenas por imersão do CFM em solução de NaOH não se mostra eficaz, por não remover completamente o TBHQ presente na superfície do eletrodo. Por esse motivo, foi realizada uma limpeza por voltametria cíclica do CFM em solução aquosa de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . A Figura 39 mostra os voltamogramas correspondentes às adições de TBHQ na SFME após esse novo procedimento de limpeza. Nota-se que, após esse processo, é possível observar que o pico do antioxidante voltou a se apresentar bem definido, o que comprova a hipótese de passivação da superfície do eletrodo. Como resultado, a limpeza por imersão em solução de NaOH foi descartada, adotando-se somente a limpeza com solução de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .



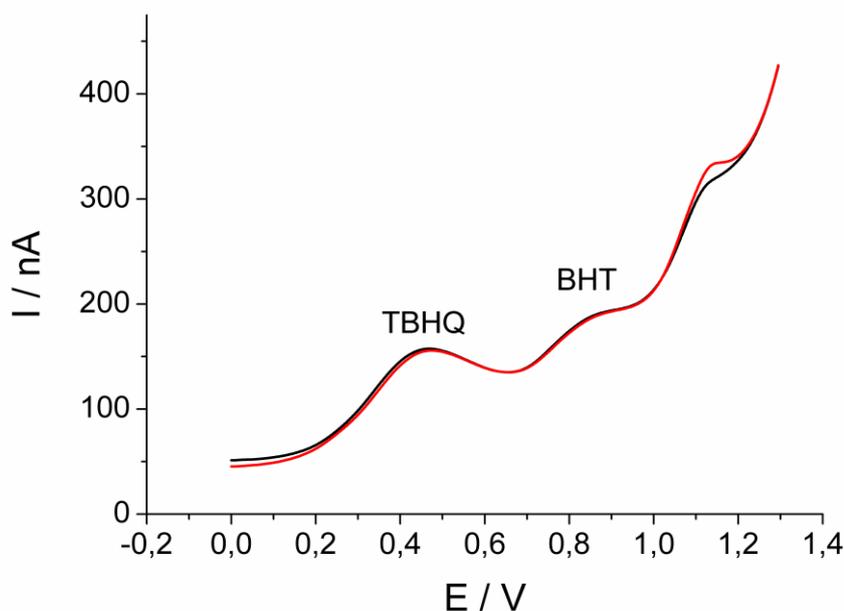
**Figura 39.** Voltamogramas de pulso diferencial em CFM tipo I de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ , após lavagem do eletrodo com solução de  $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ : (a) Ausência de TBHQ, (b) Presença de  $6,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ, (c) Presença de  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ. Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,100 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

Varreduras em presença do antioxidante BHT são mostradas na Figura 40; seu pico de oxidação aparece após o pico do TBHQ, sendo também digno de nota a boa estabilidade do eletrodo em medidas consecutivas. Não foi possível realizar a separação do BHA e do PG, visto que seus potenciais de oxidação possuem valores extremamente próximos daqueles do BHT e do TBHQ, inviabilizando a quantificação.



**Figura 40.** Voltamogramas de pulso diferencial em CFM tipo I de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ , na presença de TBHQ e BHT, nas concentrações de  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $7,70 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente, após lavagem do eletrodo com  $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,100 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

A Figura 41 apresenta voltamogramas referentes à SWV, obtidos após a limpeza com  $\text{KCl}$ , nos quais também é possível observar a boa estabilidade do eletrodo em medidas consecutivas.



**Figura 41.** Voltamogramas de onda quadrada em CFM tipo I de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ , na presença de TBHQ e BHT, nas concentrações de  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $7,70 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente, após lavagem do eletrodo com  $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 1,100 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

Apesar dos procedimentos de lavagem do eletrodo com a solução de  $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , para aumentar a repetibilidade e reprodutibilidade das medidas, possivelmente houve adsorção dos antioxidantes analisados na superfície porosa do CFM, pois mesmo com concentrações crescentes dos antioxidantes a corrente medida não mostrou aumento de intensidade. Lavagens por voltametria cíclica não mais apresentaram melhora nas respostas, nem a utilização de limpeza em banho ultra-sônico. Por esse motivo, foi escolhido novo eletrodo de trabalho, um de Au, mantendo o meio de estudo e os antioxidantes a serem analisados.

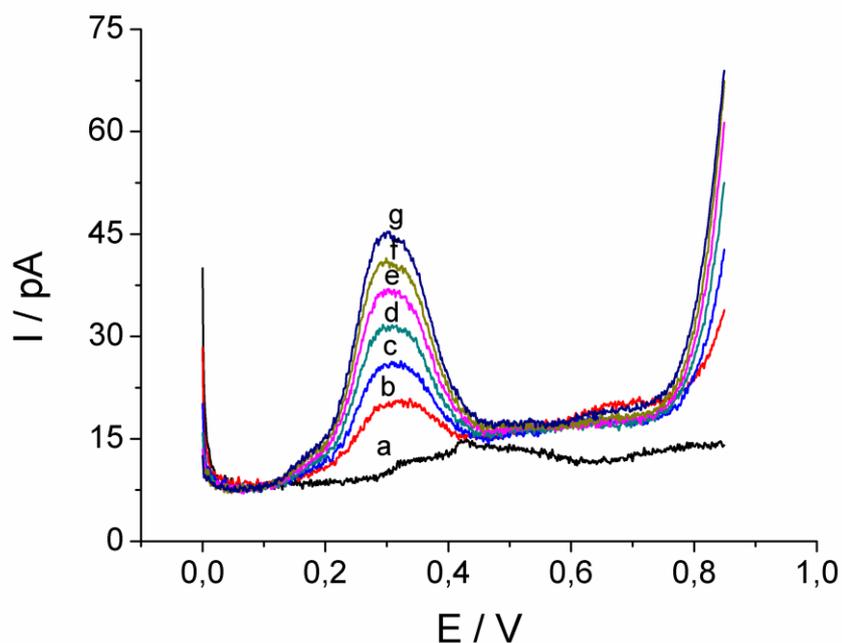
#### **4.1.4 Quantificação Simultânea de TBHQ e BHT em SFME A/O de Biodiesel Empregando uma de Au como Eletrodo de Trabalho**

##### **4.1.4.1 Comportamento do Meio Solvente**

Uma vez que os FAMEs apresentam propriedades similares aos surfactantes não-iônicos devido à presença de grupos hidrofóbicos em uma parte de sua estrutura e grupos hidrofílicos em outra, eles podem atuar como surfactantes em uma SFME, facilitando a sua preparação.<sup>156</sup>

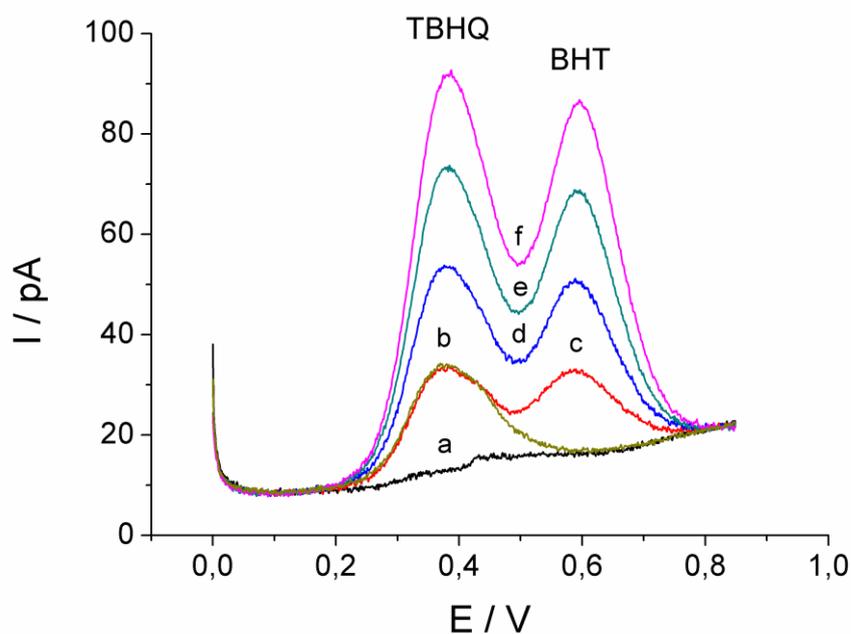
Para avaliar a resposta eletroquímica dessa microemulsão em ultramicroeletrodo de Au foram realizados experimentos por DPV na mistura de *n*-propanol e água contendo 0,02 mol L<sup>-1</sup> de N(Butyl)<sub>4</sub>BF<sub>4</sub>, na presença de porcentagens crescentes de biodiesel, variando de 0,3% a 1,8%.

A Figura 42 apresenta os voltamogramas obtidos a partir desses experimentos. Observa-se uma onda em torno de 0,300 V (curva b), provavelmente devido à oxidação de um antioxidante natural presente no biodiesel, potencial esse próximo ao potencial de oxidação do TBHQ. As curvas subsequentes mostram uma relação linear entre a porcentagem do biocombustível e a corrente de pico. Portanto, o meio solvente permite desenvolver uma técnica quantitativa para a determinação de aditivos no biodiesel.



**Figura 42.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ , sem adição de antioxidantes: (a) Ausência de biodiesel, (b - g) Porcentagens crescentes de biodiesel (em volume) (0,3%, 0,6%, 0,9%, 1,2%, 1,5% e 1,8%, respectivamente). Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,850 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV, largura de pulso de 50 ms. Contra-eletródo e quasi-referência em Pt.

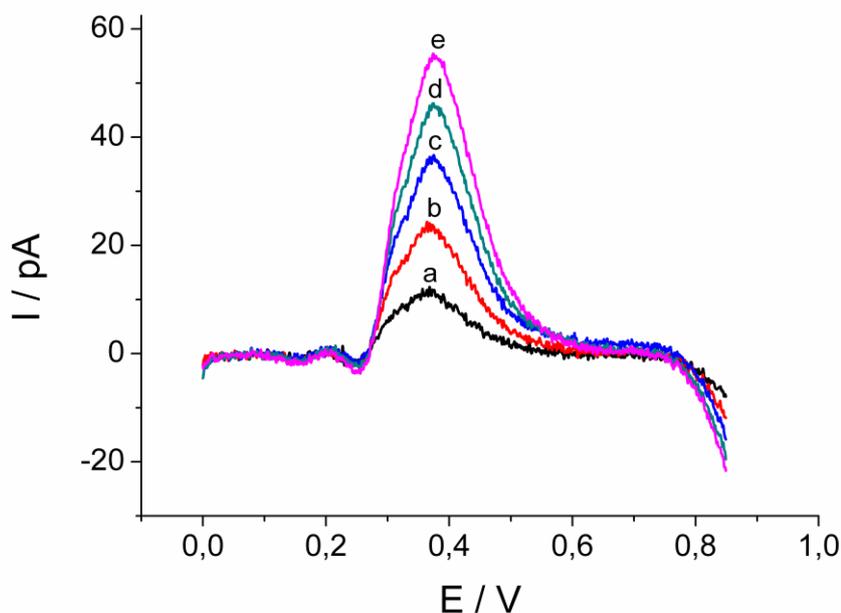
Para fins de comparação, foram realizadas varreduras por DPV em *n*-propanol contendo simultaneamente TBHQ e BHT. A Figura 43 mostra os respectivos voltamogramas obtidos após adições sucessivas de TBHQ e BHT. É possível observar que a magnitude do pico da diferencial da corrente de oxidação do TBHQ é cerca de 1,5 vezes maior em meio microemulsionado do que em *n*-propanol puro, para a mesma concentração do antioxidante, como observado nas figuras subsequentes. Apesar de a SFME conter biodiesel e o mesmo causar um decréscimo na condutividade do meio, a presença da água se contrapõe, aumentando a condutividade e portanto, a magnitude do pico da diferencial da corrente de oxidação na SFME se comparada com o *n*-propanol puro.



**Figura 43.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma eletrodo de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de *n*-propanol contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ , na ausência de biodiesel: (a) *n*-propanol puro, (b) Presença de  $2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ, (c) Presença de  $2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ e  $1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de BHT, (d - f) Concentrações crescentes de TBHQ ( $4,70 \times 10^{-4}$ ,  $6,90 \times 10^{-4}$  e  $9,05 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) e BHT ( $3,55 \times 10^{-4}$ ,  $5,20 \times 10^{-4}$  e  $6,80 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ). Faixa de potencial entre  $0,000 \text{ V}$  e  $0,850 \text{ V}$ , velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de  $10 \text{ mV}$  e largura de pulso de  $50 \text{ ms}$ . Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

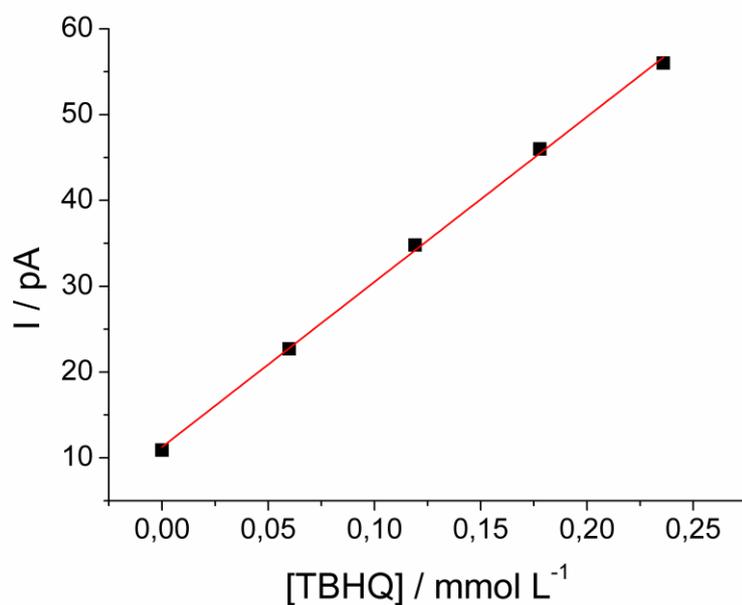
#### 4.1.4.2 Curvas de Calibração para TBHQ e BHT

Diferentemente do comportamento observado nos voltamogramas referentes às curvas de calibração do PG e TBHQ em meio etanólico (Figuras 15 e 17, respectivamente), os antioxidantes reportados nesta seção não apresentam seus potenciais de oxidação deslocados para potenciais mais positivos a cada adição sucessiva de solução-estoque. A Figura 44 mostra os voltamogramas da oxidação do TBHQ em SFME de biodiesel após a subtração da corrente do branco. É possível observar um  $E_p$  de aproximadamente  $0,390 \text{ V}$ , bem como um aumento linear da corrente com a concentração do antioxidante.



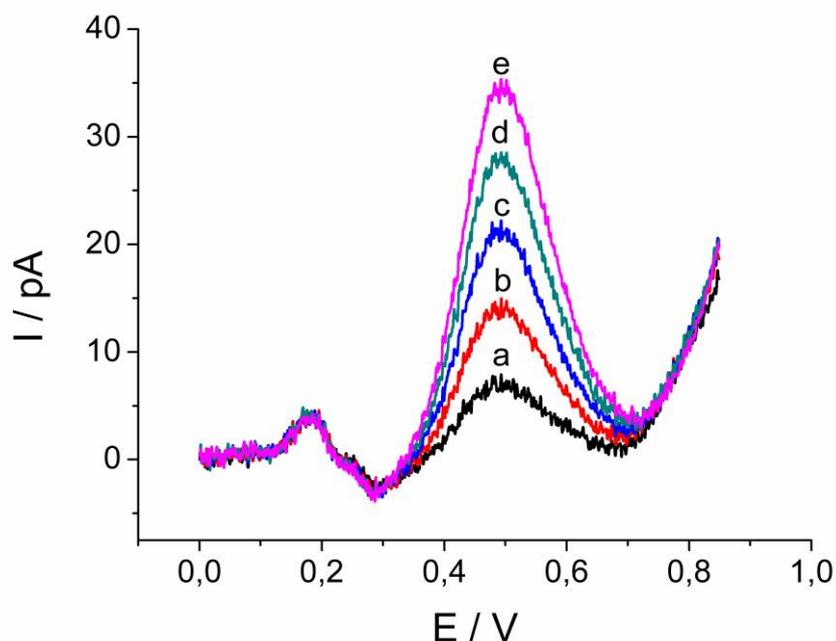
**Figura 44.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : (a - e) Concentrações de TBHQ entre  $1,20 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e  $2,40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre  $0,000 \text{ V}$  e  $0,850 \text{ V}$ , velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de  $10 \text{ mV}$  e largura de pulso de  $50 \text{ ms}$ . Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

A Figura 45 mostra a curva de calibração obtida para o TBHQ e a relação linear entre intensidade de corrente e concentração do antioxidante, na faixa entre  $1,20 \times 10^{-4}$  e  $2,40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Ambos LD e LQ foram calculados por meio das fórmulas 2 e 3, obtendo-se os valores de  $5,62 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,88 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente; a sensibilidade foi  $1,92 \times 10^{-7} \text{ A L mol}^{-1}$  e o coeficiente de correlação  $r$  foi  $0,9988$ .



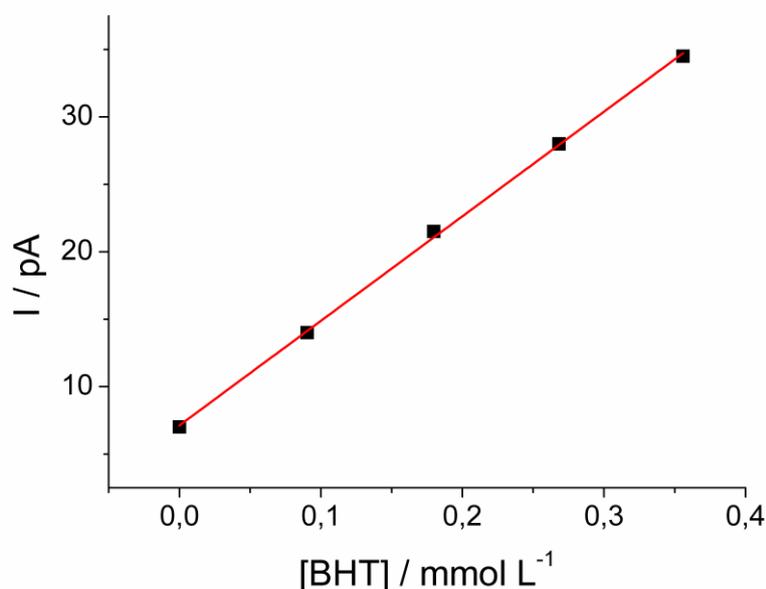
**Figura 45.** Curva de calibração para quantificação individual de TBHQ em SFME A/O de biodiesel de acordo com a Figura 44.

A Figura 46 mostra voltamogramas de pulso diferencial para a quantificação individual do BHT em SFME de biodiesel após a subtração da corrente do branco. Observa-se um  $E_p$  de aproximadamente 0,500 V e um aumento linear da corrente com o aumento da concentração do antioxidante, na faixa de  $9,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a  $3,56 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 46.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : (a - e) Concentrações de BHT entre  $9,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e  $3,56 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,850 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

A Figura 47 apresenta a curva de calibração obtida para o BHT, sendo possível observar a relação linear entre o pico de corrente diferencial e a concentração do antioxidante na faixa de  $9,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a  $3,56 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Do mesmo modo que para o TBHQ, LD e LQ foram calculados por meio das fórmulas 2 e 3 já apresentadas, obtendo-se valores de  $4,22 \times 10^{-4}$  e  $1,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente; a sensibilidade foi de  $7,75 \times 10^{-8} \text{ A L mol}^{-1}$  e o coeficiente de correlação  $r$  foi 0,9992.



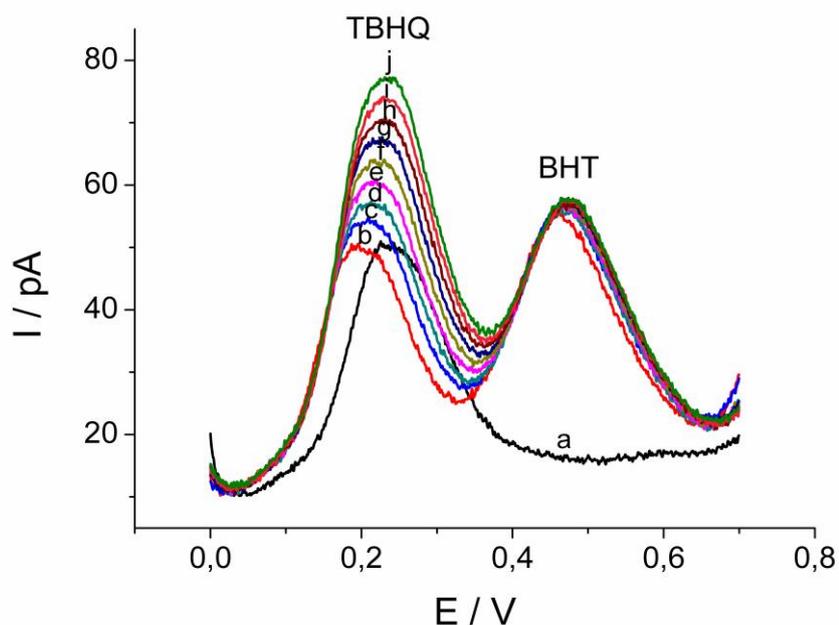
**Figura 47.** Curva de calibração para quantificação individual de BHT em SFME A/O de biodiesel de acordo com a Figura 46.

Como já mencionado, ao contrário do observado nas Figuras 15 e 17, referentes aos experimentos realizados em uma de Pt e meio etanólico, os voltamogramas mostrados nas Figuras 44 e 46 não apresentam deslocamento do potencial com concentrações crescentes de antioxidante, evidenciando um grau de reversibilidade das reações de oxidação maior neste meio do que em etanol.

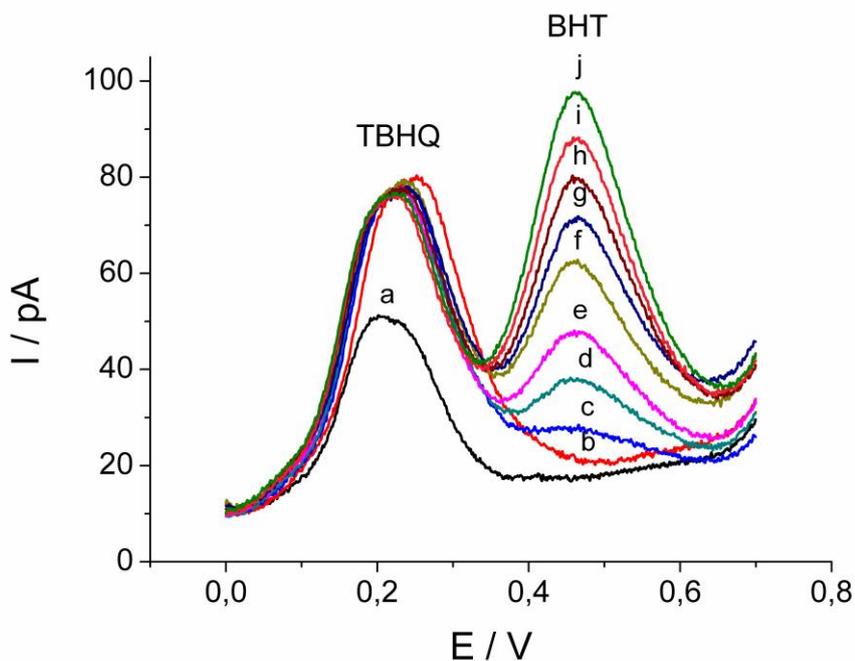
#### 4.1.4.3 Análise da Interferência Mútua entre TBHQ e BHT

Com o intuito de avaliar a extensão da interferência mútua entre BHT e TBHQ, foram realizadas medidas por DPV de amostras contendo tanto  $3,50 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de BHT e diferentes concentrações de TBHQ como  $3,50 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de TBHQ e diferentes concentrações de BHT.

Após a subtração da corrente do branco, dois picos de oxidação bem definidos foram observados. O  $E_p$  para o TBHQ foi de aproximadamente 0,210 V e para o BHT foi de 0,480 V (vistos nas Figuras 48 e 49, respectivamente). Na presença de TBHQ, os potenciais de oxidação do BHT apresentam um ligeiro desvio da linearidade com crescentes concentrações desse antioxidante.

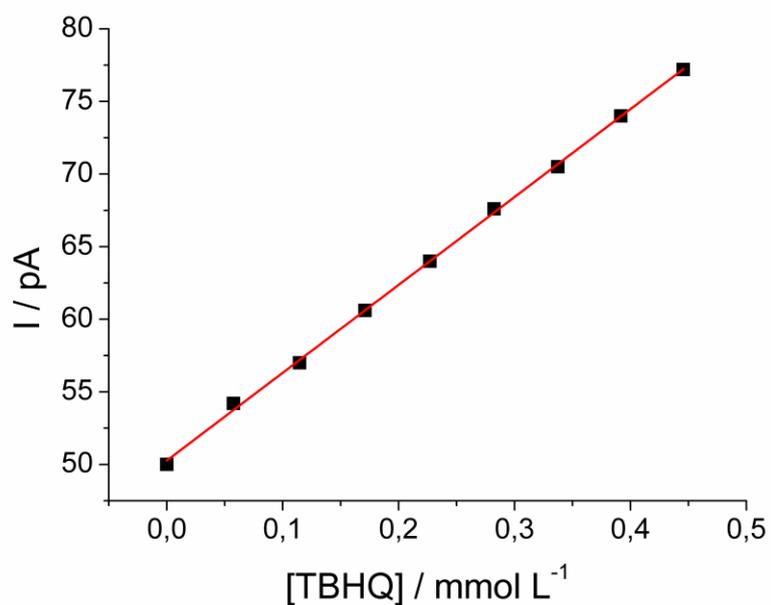


**Figura 48.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : (a) Branco, (b) Presença de  $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de BHT, (c - j) Concentrações crescentes de TBHQ de  $5,76 \times 10^{-5}$  a  $4,46 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  na presença de  $3,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de BHT. Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,700 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

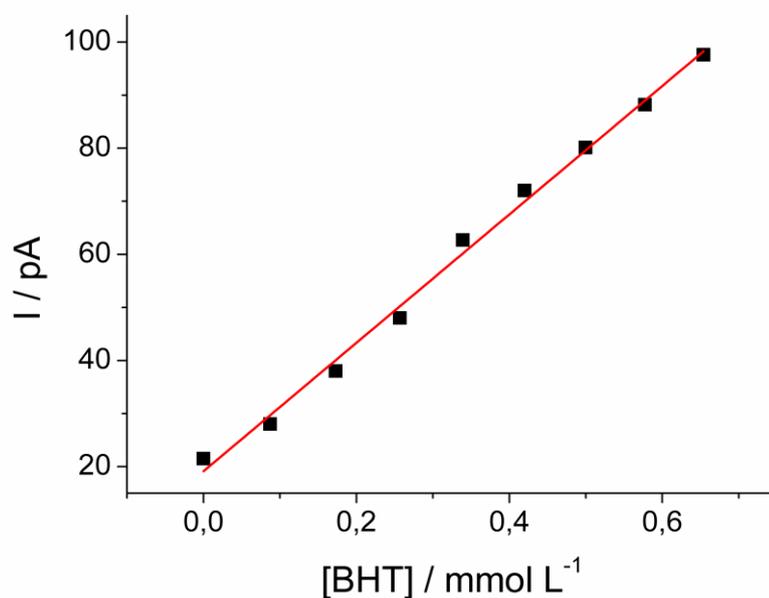


**Figura 49.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : (a) Branco, (b) Presença de  $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ, (c - j) Concentrações crescentes de BHT de  $8,73 \times 10^{-5}$  a  $6,54 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  na presença de  $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ. Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,700 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.

As Figuras 50 e 51 mostram as respectivas curvas de calibração obtidas para TBHQ e BHT a partir dos voltamogramas apresentados nas Figuras 48 e 49, respectivamente.



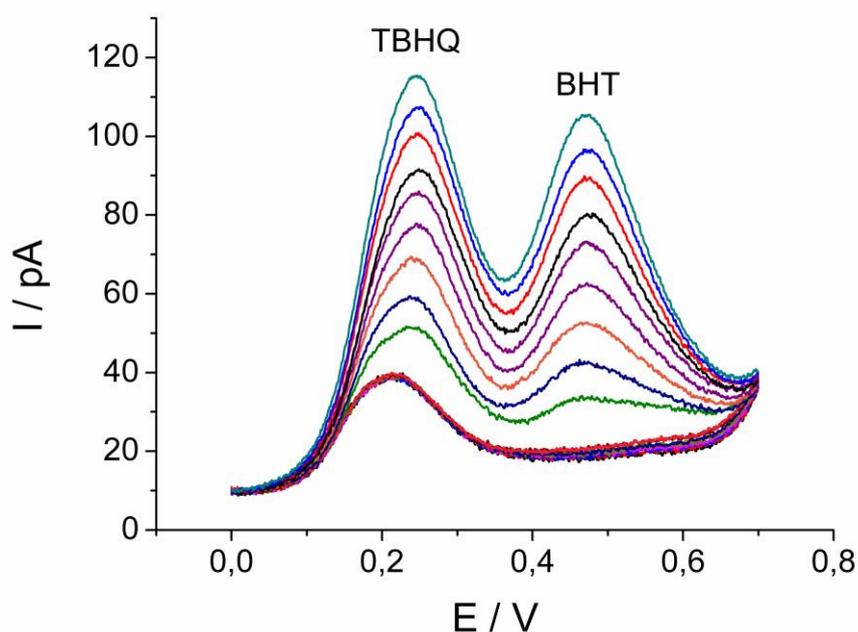
**Figura 50.** Curva de calibração para a quantificação individual de TBHQ, em presença de  $3,50 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de BHT em SFME A/O de biodiesel de acordo com a Figura 48.



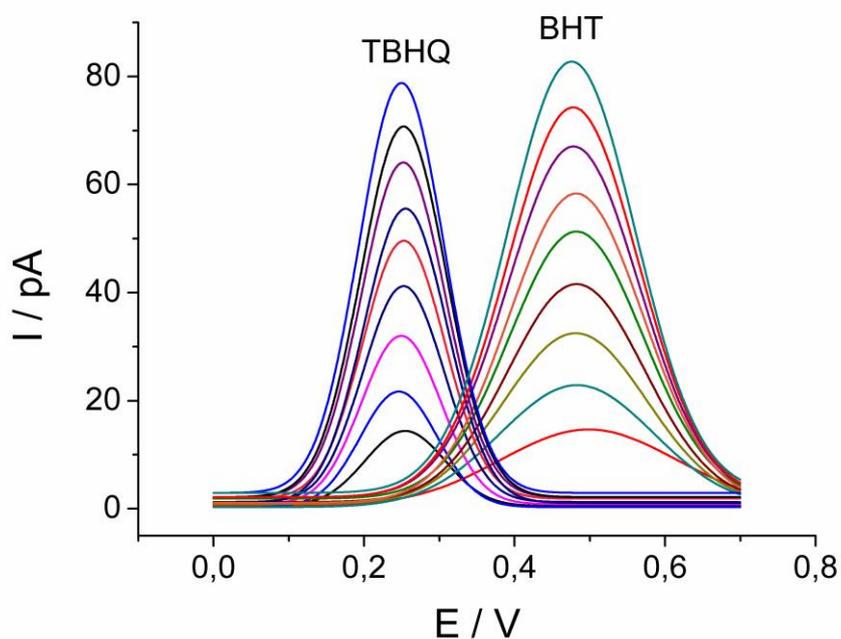
**Figura 51.** Curva de calibração para a quantificação individual de BHT, em presença de  $3,50 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de TBHQ em SFME A/O de biodiesel de acordo com a Figura 49.

#### 4.1.4.4 Quantificação Simultânea de TBHQ e BHT

A quantificação simultânea de TBHQ e BHT em SFME de biodiesel, mostrada na Figura 52, requer um tratamento por deconvolução (apresentado na Figura 53) devido a uma sobreposição significativa das correntes de oxidação. Uma vez que ambos antioxidantes são afetados pelo sinal de fundo da matriz do biodiesel, os voltamogramas foram diferenciados por meio da subtração da linha de base e então deconvoluídos.

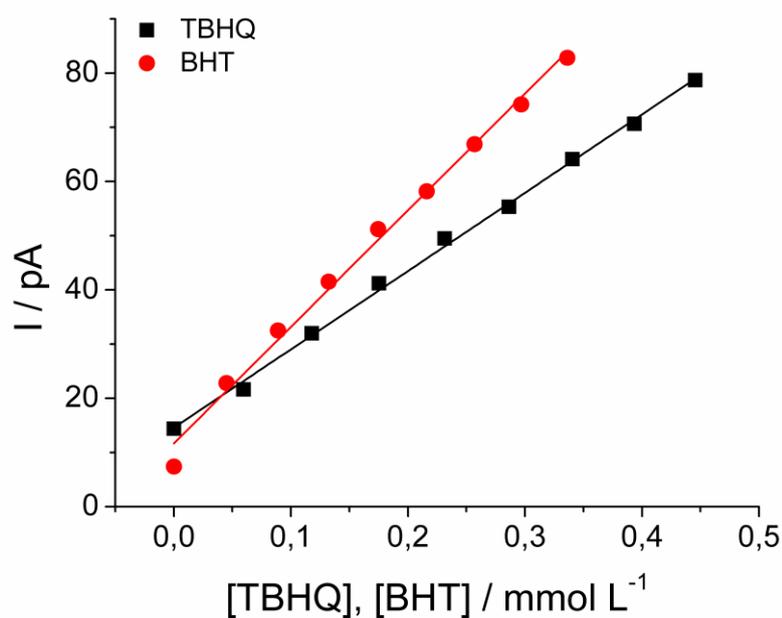


**Figura 52.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : Adições sucessivas de TBHQ de  $6,02 \times 10^{-5}$  a  $4,46 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e de BHT de  $4,54 \times 10^{-5}$  a  $3,36 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,700 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.



**Figura 53.** Dados obtidos a partir do procedimento de deconvolução referente aos voltamogramas da Figura 52.

A Figura 54 apresenta as curvas de adição de padrão obtidas a partir dos resultados da deconvolução, para ambos antioxidantes TBHQ e BHT.



**Figura 54.** Curvas de adição de padrão para determinação simultânea de TBHQ e BHT de acordo com a deconvolução da Figura 53.

Nos experimentos relacionados à interferência mútua entre os antioxidantes, pode-se observar que os desvios da linearidade em concentrações crescentes são mais significativos para o BHT do que para o TBHQ (Figuras 48 e 49). No que diz respeito aos experimentos de quantificação simultânea (Figura 52), existem leves desvios nos potenciais relativos ao TBHQ. Pode-se chegar à mesma conclusão tida para o comportamento do PG quando analisado em meio etanólico: a existência de um componente cinético que possivelmente controla a concentração de ambos antioxidantes na camada de difusão, o que faz com que eles não sejam completamente independentes um do outro.

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 3 a seguir.

**Tabela 3.** Figuras de mérito para determinação de TBHQ e BHT em SFME A/O de biodiesel.

Analito	Individual		Simultânea		BHT fixo <sup>1</sup>	TBHQ fixo <sup>2</sup>
	TBHQ	BHT	TBHQ	BHT	TBHQ	BHT
Intercepto* (A)	$1,12 \times 10^{-11}$	$7,12 \times 10^{-12}$	$1,45 \times 10^{-11}$	$1,16 \times 10^{-11}$	$5,02 \times 10^{-11}$	$1,91 \times 10^{-11}$
r	0,9988	0,9992	0,9980	0,9935	0,9994	0,9950
LD (mol L <sup>-1</sup> )	$5,62 \times 10^{-4}$	$4,22 \times 10^{-4}$	$4,58 \times 10^{-4}$	$3,46 \times 10^{-4}$	$4,60 \times 10^{-4}$	$6,70 \times 10^{-4}$
LQ (mol L <sup>-1</sup> )	$1,88 \times 10^{-3}$	$1,40 \times 10^{-3}$	$1,53 \times 10^{-3}$	$1,15 \times 10^{-3}$	$1,53 \times 10^{-3}$	$2,24 \times 10^{-3}$
Sensibilidade <sup>3</sup>	$1,92 \times 10^{-7}$	$7,75 \times 10^{-8}$	$1,44 \times 10^{-7}$	$2,15 \times 10^{-7}$	$6,05 \times 10^{-8}$	$1,20 \times 10^{-7}$

<sup>1</sup> BHT fixo em  $3,50 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>

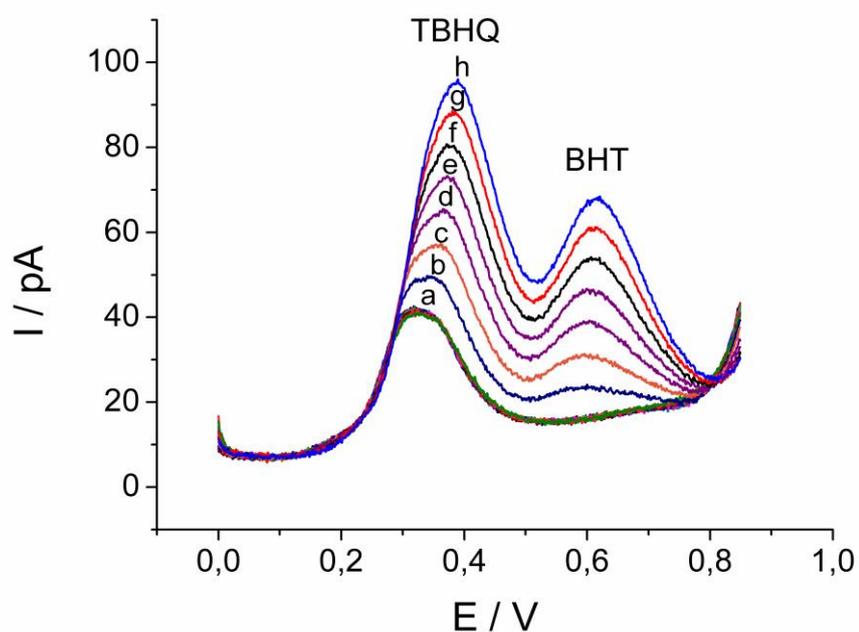
<sup>2</sup> TBHQ fixo em  $3,50 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>

<sup>3</sup> Sensibilidade: A L mol<sup>-1</sup>

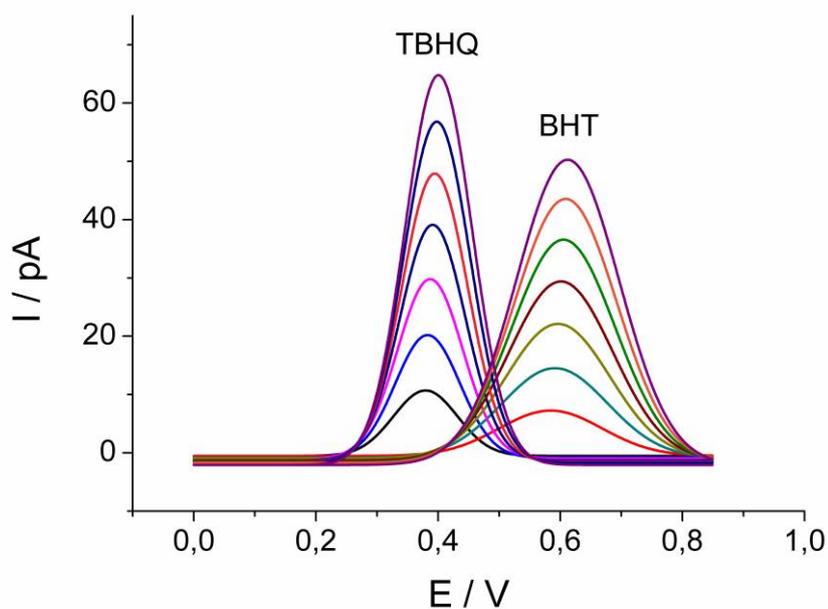
Os resultados apresentados na Tabela 3 acima mostram que a curva de adição de padrão para a determinação simultânea dos antioxidantes TBHQ e BHT apresenta excelente sensibilidade, bem como limites de detecção da mesma ordem de grandeza para ambos antioxidantes.

#### 4.1.4.5 Experimentos de Recuperação

Foram realizados experimentos de recuperação em amostra de biodiesel livre de antioxidantes em microemulsão, fortificada com concentrações variáveis de TBHQ e BHT. A Figura 55 mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos pelo método de adição de padrão. Após subtração da corrente do branco e deconvolução dos voltamogramas, os picos de oxidação de ambos antioxidantes são facilmente distinguíveis, como mostra a Figura 56.

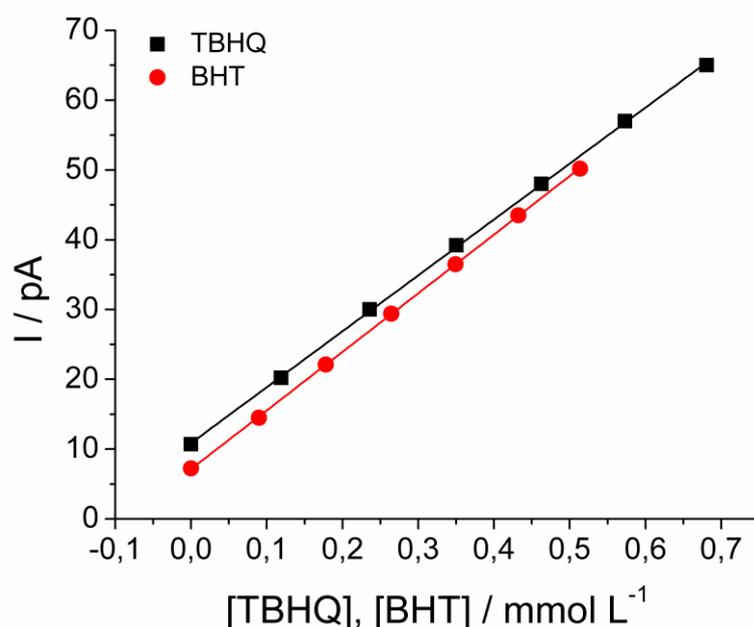


**Figura 55.** Voltamogramas de pulso diferencial em uma de Au ( $r = 5 \mu\text{m}$ ) de SFME A/O de biodiesel (71% *n*-propanol, 11% água, 18% biodiesel (m/m)) contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{N}(\text{Butyl})_4\text{BF}_4$ : (a) Branco, (b) Amostras de biodiesel fortificadas com  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ e  $9,08 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de BHT, (c - h) Adições sucessivas de ambos antioxidantes. Faixa de potencial entre 0,000 V e 0,850 V, velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 mV e largura de pulso de 50 ms. Contra-eletrodo e quasi-referência em Pt.



**Figura 56.** Dados obtidos a partir do procedimento de deconvolução referente aos voltamogramas da Figura 55.

A Figura 57 apresenta as respectivas curvas de adição de padrão para ambos antioxidantes TBHQ e BHT.



**Figura 57.** Curvas de adição de padrão para determinação simultânea de TBHQ e BHT de acordo com a deconvolução da Figura 56.

Foram obtidos valores de recuperação de 90% para o TBHQ e de 99,5% para o BHT com a metodologia proposta, indicando precisão e exatidão satisfatórias. Desse modo, ela pode ser empregada para determinação direta de TBHQ e BHT em biodiesel sem a necessidade de pré-tratamento da amostra.

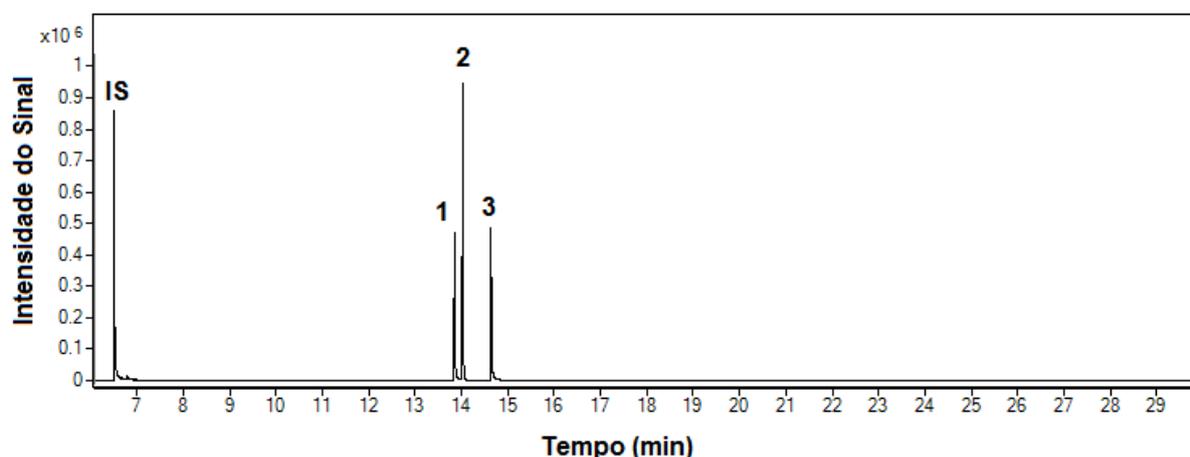
## 4.2 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA

### 4.2.1 Análise por GC/qMS

As técnicas cromatográficas para análise dos mais variados analitos, incluindo os antioxidantes sintéticos, estão bem estabelecidas na literatura; entretanto, a maior parte dos trabalhos requer extração do analito da amostra. Os resultados dos experimentos apresentados a seguir mostram a viabilidade da realização da análise cromatográfica direta, apenas por diluição do biodiesel em solvente adequado.

Inicialmente foram determinados os tempos de eluição de TBHQ, BHA, BHT e PG e do padrão interno (IS, do inglês *internal standard*) em metanol, ou seja, sem interferência da

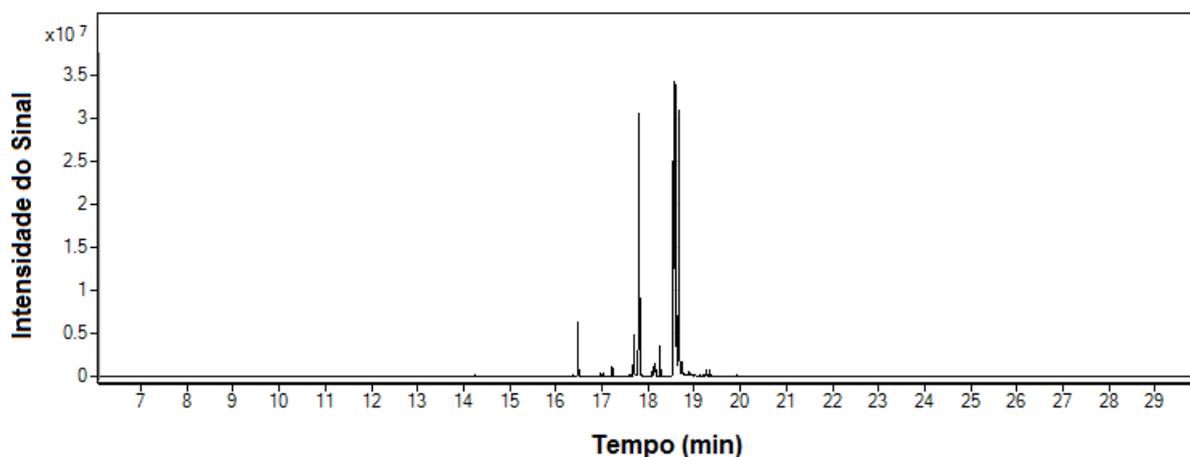
matriz de biodiesel. A Figura 58 mostra o cromatograma obtido por GC/qMS. Nesse experimento, o único antioxidante não detectado foi o PG, sendo necessário realizar uma derivatização do composto, o que, no presente estudo, não caracterizaria uma análise direta.



**Figura 58.** Cromatograma por GC/qMS em metanol: (IS) fenol  $2,10 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, (1) BHA  $5,50 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, (2) BHT  $4,50 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, (3) TBHQ  $6,10 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Coluna Agilent HP-5ms (30 m  $\times$  0,25 mm i.d.  $\times$  0,25  $\mu$ m espessura), temperatura inicial 40 °C (por 2 min), rampas de 10 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C e de 30 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C, amostras (1  $\mu$ L) injetadas a 300 °C com *split ratio* 1:10, fluxo do gás carreador He 1,5 mL min<sup>-1</sup>.

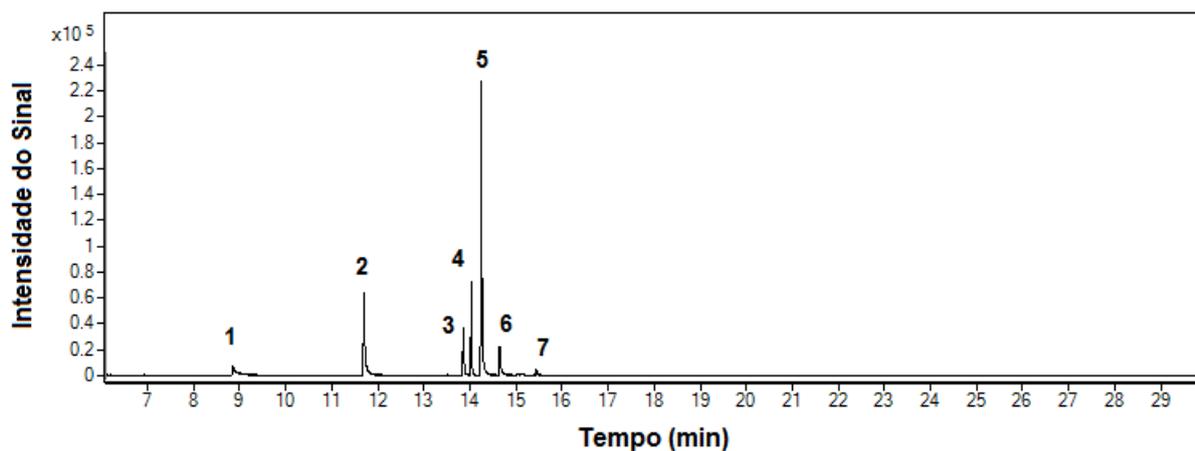
Observa-se que o BHA apresenta o menor tempo de retenção, seguido do BHT e do TBHQ. O ponto de ebulição do TBHQ é maior do que o dos outros dois antioxidantes, ou seja, ele é o último a evaporar; dessa forma, permanece mais tempo em seu estado físico original e, ao atingir o estado gasoso, seu tempo de retenção é maior do que os tempos dos outros antioxidantes. Com relação ao BHA e BHT, ambos possuem valores de polaridade próximos, mas o primeiro elui mais rapidamente em colunas de baixa polaridade devido ao menor número de átomos de carbono em sua estrutura; no entanto, em colunas de maior polaridade, a ordem de eluição é invertida devido à maior interação e retenção do BHA (ligeiramente mais polar que o BHT) com a fase estacionária.<sup>157</sup>

A Figura 59 apresenta o cromatograma obtido por GC/qMS para uma amostra de biodiesel fortificada com os antioxidantes BHA, BHT e TBHQ; entretanto, nenhum pico correspondente a eles pode ser visualizado.



**Figura 59.** Cromatograma por GC/qMS de amostra de biodiesel fortificada com BHA, BHT e TBHQ ( $2,80 \times 10^{-3}$ ,  $2,30 \times 10^{-3}$  e  $3,00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente). Coluna Agilent HP-5ms (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm espessura); temperatura inicial 40 °C (por 2 min), rampas de 10 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C e de 30 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C, amostras (1 μL) injetadas a 300 °C com *split ratio* 1:50, fluxo do gás carreador He 1,5 mL min<sup>-1</sup>. Amostra de biodiesel diluída 50 vezes em metanol.

Devido à alta intensidade dos picos do biocombustível (como mostra a Figura 59), os quais eluíram após 16 minutos de corrida, nenhum pico correspondente a qualquer dos antioxidantes pode ser observado na análise de uma amostra de biodiesel de óleo residual de fritura, diluída 50 vezes em metanol e fortificada com os antioxidantes investigados. Neste experimento, a presença dos antioxidantes e também do IS foi mascarada em razão do fundo de escala do detector apresentar um fator de autoajuste da ordem de 10<sup>7</sup>. Devido ao fato de, na corrida com metanol, os antioxidantes eluírem antes do tempo de 16 minutos (mostrado na Figura 58), optou-se por desligar o detector nesse tempo, o que alterou o fator de autoajuste para 10<sup>5</sup>, permitindo assim a visualização dos picos. Após este procedimento, diversos compostos presentes no biodiesel foram identificados, inclusive os antioxidantes, como mostra a Figura 60.

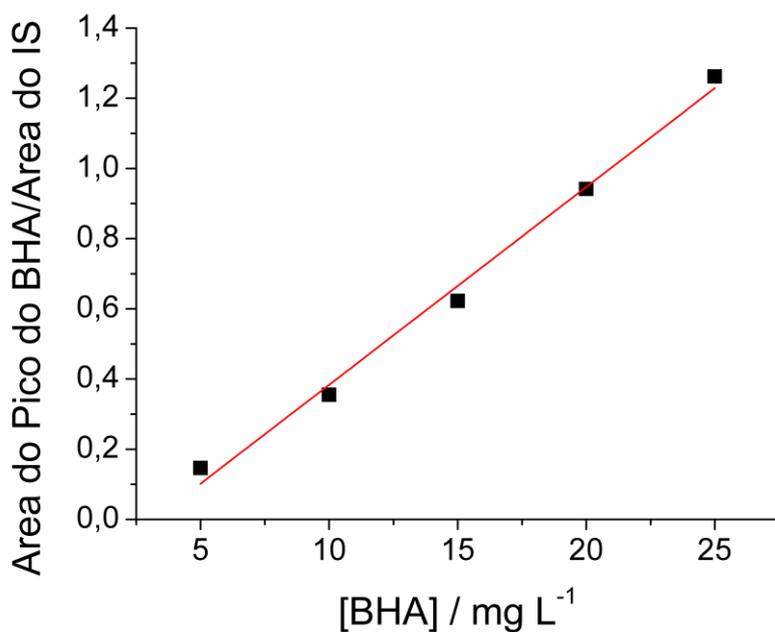


**Figura 60.** Cromatograma por GC/qMS de amostra de biodiesel fortificada com BHA, BHT e TBHQ ( $2,80 \times 10^{-3}$ ,  $2,30 \times 10^{-3}$  e  $3,00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente): (1) Éster octanoato, (2) Éster decanoato, (3) BHA, (4) BHT, (5) Éster dodecanoato, (6) TBHQ, (7) Éster tridecanoato. Coluna Agilent HP-5ms (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm espessura), temperatura inicial 40 °C (por 2 min), rampas de 10 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C e de 30 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C, amostras (1 μL) injetadas a 300 °C com *split ratio* 1:10, fluxo do gás carreador He 1,5 mL min<sup>-1</sup>. Detector desligado após 16 minutos de corrida. Amostra de biodiesel diluída 50 vezes em metanol.

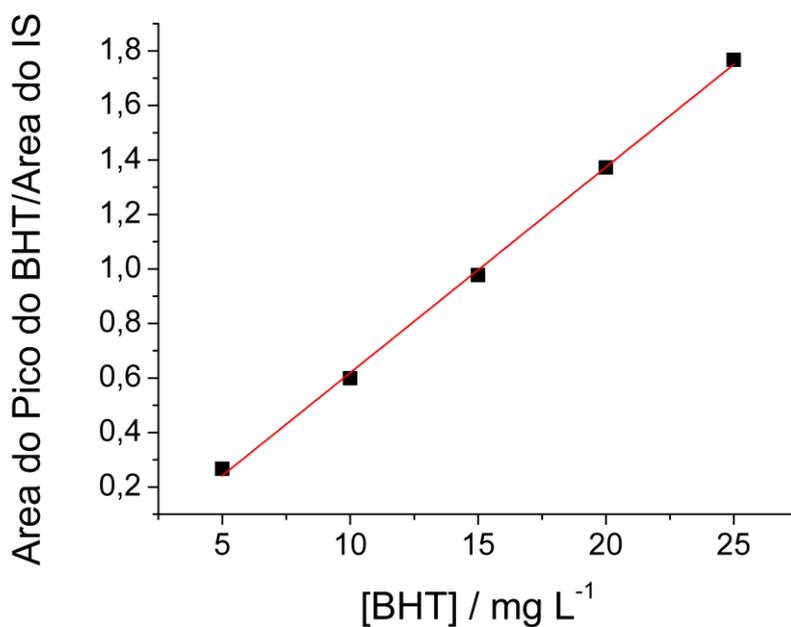
Para diminuir a intensidade dos picos dos ésteres do biodiesel, as amostras foram diluídas 50 vezes em metanol e um *split ratio* de 1:50 foi empregado. Na construção das curvas de calibração o *split ratio* utilizado foi de 1:10, uma vez que as mesmas foram obtidas com amostras livres da presença de biodiesel.

#### 4.2.1.1 Curvas de Calibração e Limites de Detecção

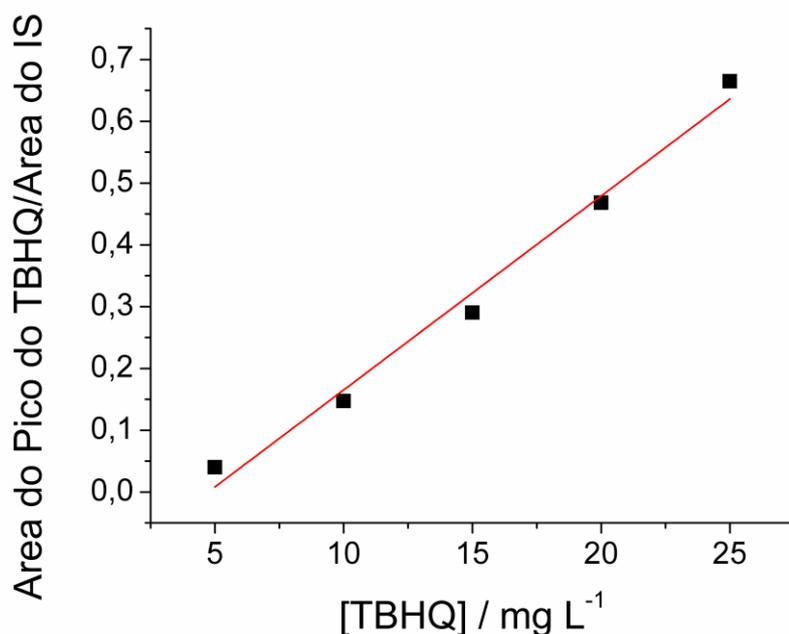
As curvas de calibração (Figuras 61, 62 e 63) nas análises por GC/qMS foram construídas para os três antioxidantes detectados por meio da injeção de uma mistura dos mesmos em diferentes concentrações, plotando-se a concentração do antioxidante *versus* a razão área do pico do antioxidante/área do pico do IS.



**Figura 61.** Curva de calibração para BHA gerada a partir de análises GC/qMS, com concentração variando entre 5 e 25 mg L<sup>-1</sup> ( $2,80 \times 10^{-2}$  e  $1,40 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>).



**Figura 62.** Curva de calibração para BHT gerada a partir de análises GC/qMS, com concentração variando entre 5 e 25 mg L<sup>-1</sup> ( $2,30 \times 10^{-2}$  e  $1,15 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>).



**Figura 63.** Curva de calibração para TBHQ gerada a partir de análises GC/qMS, com concentração variando entre 5 e 25 mg L<sup>-1</sup> ( $3,00 \times 10^{-2}$  e  $1,50 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>).

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 4 a seguir.

**Tabela 4.** Figuras de mérito para determinação de BHA, BHT e TBHQ em biodiesel diluído em metanol por GC/qMS.

Analito	BHA	BHT	TBHQ
LWR (mg L <sup>-1</sup> )	5 - 25	5 - 25	5 - 25
LWR (mmol L <sup>-1</sup> )	$2,80 \times 10^{-2}$ - $1,40 \times 10^{-1}$	$2,30 \times 10^{-2}$ - $1,15 \times 10^{-1}$	$3,00 \times 10^{-2}$ - $1,50 \times 10^{-1}$
Intercepto	-0,18005	-0,13562	-0,14884
r	0,9904	0,9985	0,9868
LD (mg L <sup>-1</sup> /μmol L <sup>-1</sup> )	0,25 / 1,40	0,05 / $2,25 \times 10^{-1}$	0,75 / 4,50
Inclinação da reta	0,05636	0,07546	0,0314

LWR: faixa de trabalho linear; r: coeficiente de correlação; LD: limite de detecção.

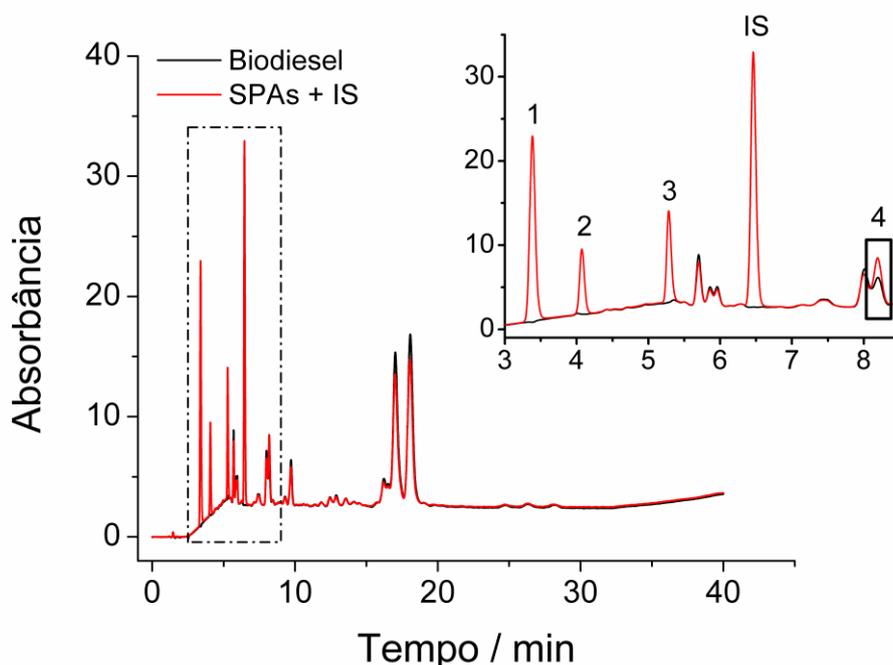
Os resultados apresentados na Tabela 4 acima mostram que as curvas de calibração para a determinação simultânea de BHA, BHT e TBHQ em amostras de biodiesel apresentam bons coeficientes de correlação e limites de detecção.

## 4.2.2 Análise por HPLC-UV

### 4.2.2.1 Seleção de Coluna e Comprimento de Onda

Os efeitos da natureza da coluna e a determinação do melhor comprimento de onda na separação de BHA, BHT, TBHQ e PG adicionados a amostras de biodiesel foram investigados.

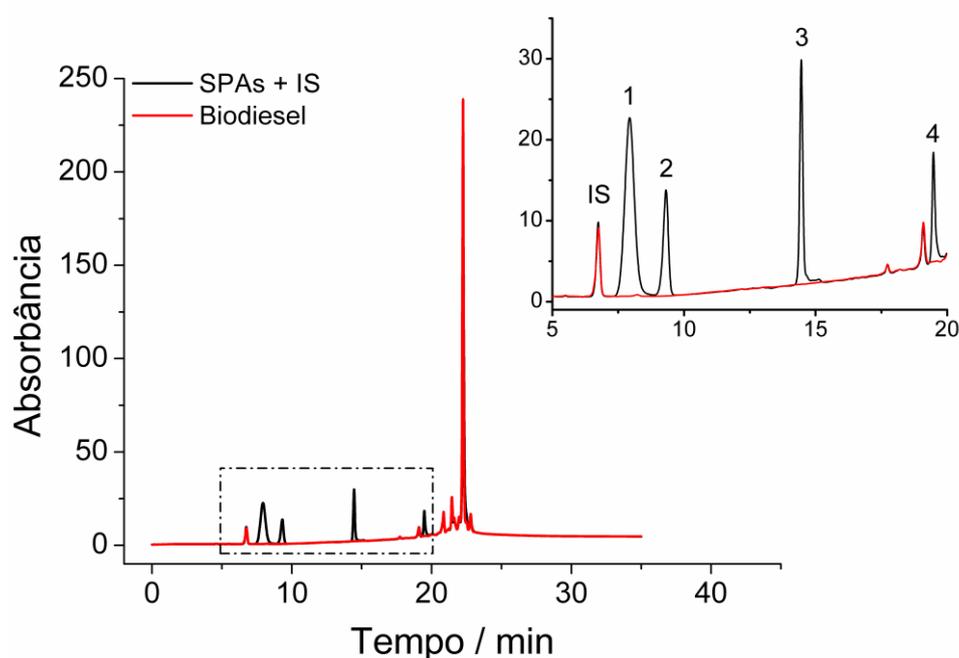
A Figura 64 mostra os cromatogramas obtidos para análise do biodiesel fortificado com os quatro antioxidantes, em uma coluna C18. Apesar da boa separação obtida por tal coluna, houve a co-eluição do BHT e do FAME C14:0 (éster tetradecanoato) (ver pico 4 da figura inserida). A co-eluição foi observada mesmo após otimizada a razão entre as fases móvel e aquosa, o que leva à identificação e quantificação não confiáveis desse antioxidante em amostras reais.



**Figura 64.** Cromatogramas por HPLC-UV de amostra de biodiesel fortificada com BHA, BHT, TBHQ e PG ( $3,40 \times 10^{-3}$ ,  $3,20 \times 10^{-3}$ ,  $4,20 \times 10^{-3}$  e  $3,30 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente): (IS) Padrão interno *p*-xileno, (1) PG, (2) TBHQ, (3) BHA e (4) BHT. Coluna C18 (Grace Alltech Alltima 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 μm partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 3 min) com aumento linear até 90% v/v, mantendo-se por 27 min e aumentando até 100% v/v por 0,2 min; equilíbrio a 50% v/v de B por 1,8 min antes da injeção seguinte. Amostras (10 μL) injetadas em um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, previamente diluídas 20 vezes em metanol v/v. Comprimento de onda de 280 nm.

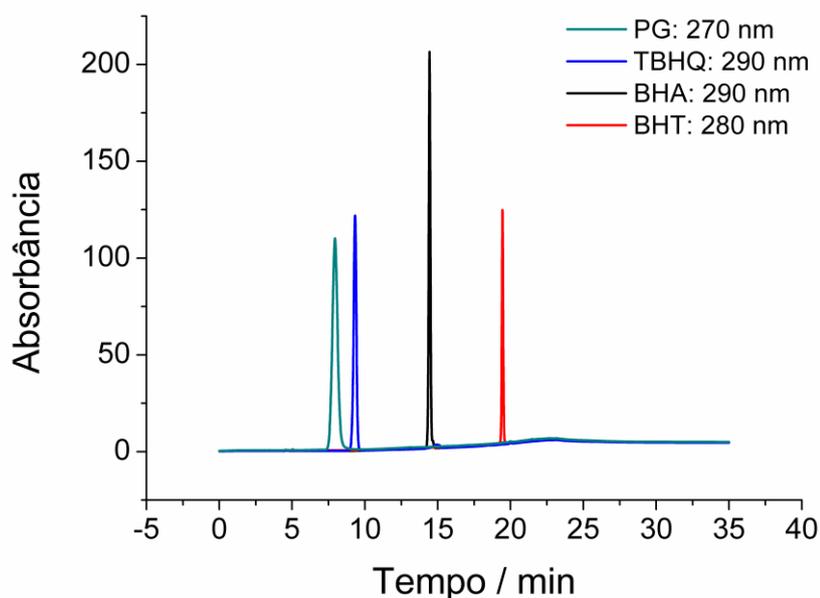
Dessa forma, foi feita a troca da coluna C18 pela coluna fenólica. A Figura 65 apresenta os cromatogramas obtidos com essa coluna na análise da mesma amostra apresentada na Figura 64. Pode-se observar a boa separação de todos os antioxidantes sem a interferência da matriz; apesar dos tempos de eluição do BHT e do FAME C14:0 serem ainda próximos, a quantificação daquele é possível uma vez que os picos estão bem separados.

É importante observar que o pico do IS também deve ser distinto dos picos dos analitos; ao trocar a coluna cromatográfica, o *p*-xileno eluiu ao mesmo tempo que o PG, sendo necessária também a substituição do IS. O fenol foi escolhido por apresentar tempo de eluição distinto dos quatro antioxidantes, possibilitando sua quantificação.



**Figura 65.** Cromatogramas por HPLC-UV de amostra de biodiesel fortificada com BHA, BHT, TBHQ e PG ( $3,40 \times 10^{-3}$ ,  $3,20 \times 10^{-3}$ ,  $4,20 \times 10^{-3}$  e  $3,30 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente): (IS) Padrão interno fenol, (1) PG, (2) TBHQ, (3) BHA e (4) BHT. Coluna Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 μm partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 17 min) com aumento linear até 100% v/v, mantendo-se por 13 min; equilíbrio a 50% v/v de B por 5 min antes da injeção seguinte. Amostras (5 μL) injetadas em um fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, previamente diluídas 20 vezes em metanol v/v. Comprimento de onda de 280 nm.

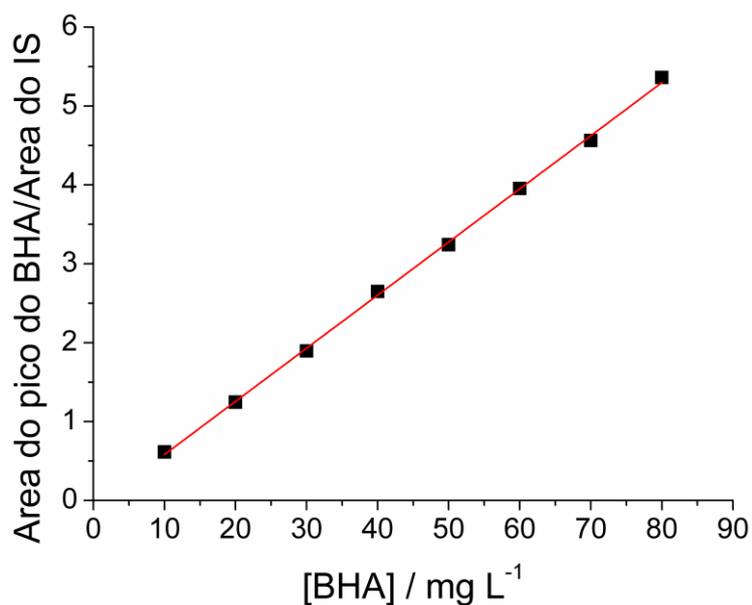
Para realizar a determinação dos limites de detecção, foi investigado o melhor comprimento de onda para cada antioxidante. A Figura 66 apresenta os cromatogramas relativos às maiores intensidades de pico para PG, TBHQ, BHA e BHT com os respectivos comprimentos de onda de 270, 290, 290 e 280 nm.



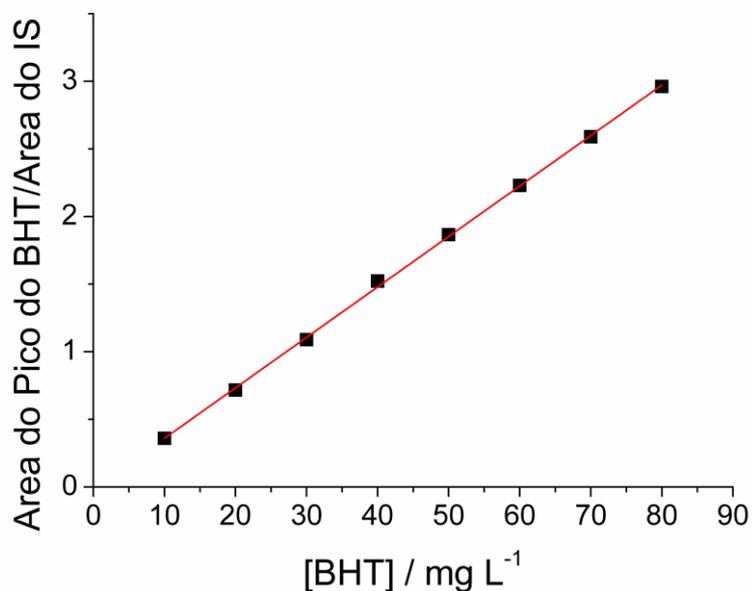
**Figura 66.** Cromatogramas por HPLC-UV em metanol com BHA, BHT, TBHQ e PG ( $3,40 \times 10^{-3}$ ,  $3,20 \times 10^{-3}$ ,  $4,20 \times 10^{-3}$  e  $3,30 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente) individualmente. Coluna Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 μm partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 17 min) com aumento linear até 100% v/v, mantendo-se por 13 min; equilíbrio a 50% v/v de B por 5 min antes da injeção seguinte. Amostras (5 μL) injetadas em um fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2.2 Curvas de Calibração e Limites de Detecção

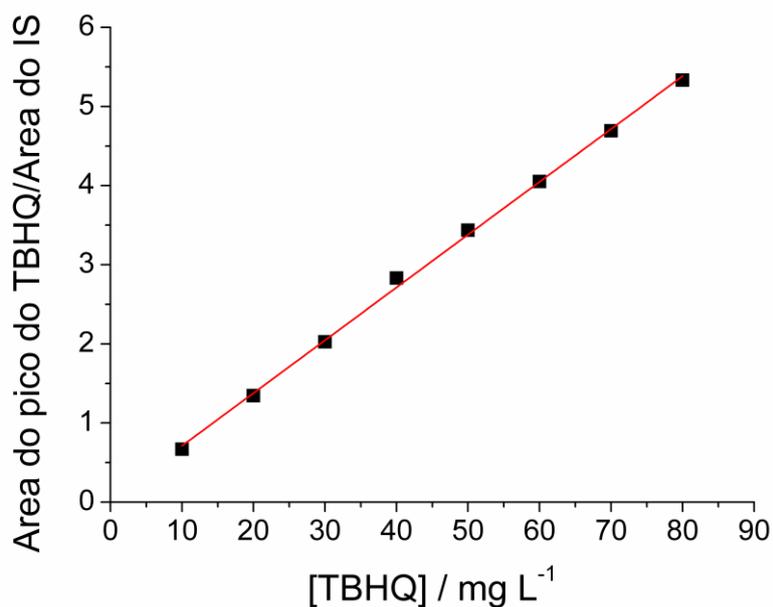
As curvas de calibração (Figuras 67, 68, 69 e 70) para as análises por HPLC-UV foram construídas para os quatro antioxidantes detectados por meio da injeção de uma mistura dos mesmos em diferentes concentrações, plotando-se a concentração do antioxidante *versus* a razão área do pico do antioxidante/área do pico do IS.



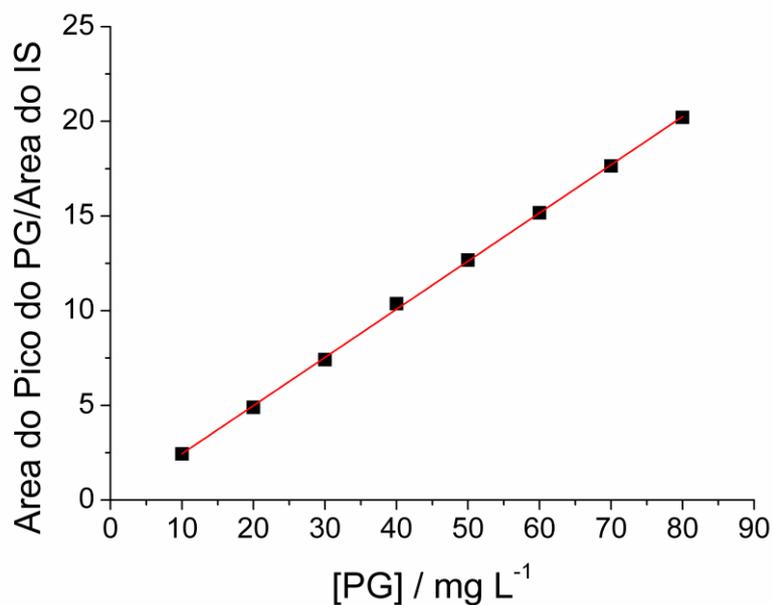
**Figura 67.** Curva de calibração para BHA gerada a partir de análises HPLC-UV, com concentração variando entre 10 e 80 mg L<sup>-1</sup> ( $5,55 \times 10^{-2}$  e  $4,40 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>). Comprimento de onda de 290 nm.



**Figura 68.** Curva de calibração para BHT gerada a partir de análises HPLC-UV, com concentração variando entre 10 e 80 mg L<sup>-1</sup> ( $4,55 \times 10^{-2}$  e  $3,65 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>). Comprimento de onda de 280 nm.



**Figura 69.** Curva de calibração para TBHQ gerada a partir de análises HPLC-UV, com concentração variando entre 10 e 80 mg L<sup>-1</sup> ( $6,00 \times 10^{-2}$  e  $4,80 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>). Comprimento de onda de 290 nm.



**Figura 70.** Curva de calibração para PG gerada a partir de análises HPLC-UV, com concentração variando entre 10 e 80 mg L<sup>-1</sup> ( $4,70 \times 10^{-2}$  e  $3,80 \times 10^{-1}$  mmol L<sup>-1</sup>). Comprimento de onda de 270 nm.

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 5 a seguir.

**Tabela 5.** Figuras de mérito para determinação de BHA, BHT, TBHQ e PG em biodiesel diluído em metanol por HPLC-UV.

Analito	BHA	BHT	TBHQ	PG
LWR (mg L <sup>-1</sup> )	10 - 80	10 - 80	10 - 80	10 - 80
LWR (mmol L <sup>-1</sup> )	5,55×10 <sup>-2</sup> - 4,40×10 <sup>-1</sup>	4,55×10 <sup>-2</sup> - 3,65×10 <sup>-1</sup>	6,00×10 <sup>-2</sup> - 4,80×10 <sup>-1</sup>	4,70×10 <sup>-2</sup> - 3,80×10 <sup>-1</sup>
Intercepto	-0,09128	-0,01272	0,04317	-0,09922
r	0,9991	0,9994	0,9985	0,9994
LD (mg L <sup>-1</sup> /μmol L <sup>-1</sup> )	0,0125 / 6,95×10 <sup>-2</sup>	0,030 / 1,35×10 <sup>-1</sup>	0,015 / 9,00×10 <sup>-2</sup>	0,010 / 4,70×10 <sup>-2</sup>
Inclinação da reta	0,06735	0,03731	0,06675	0,25439

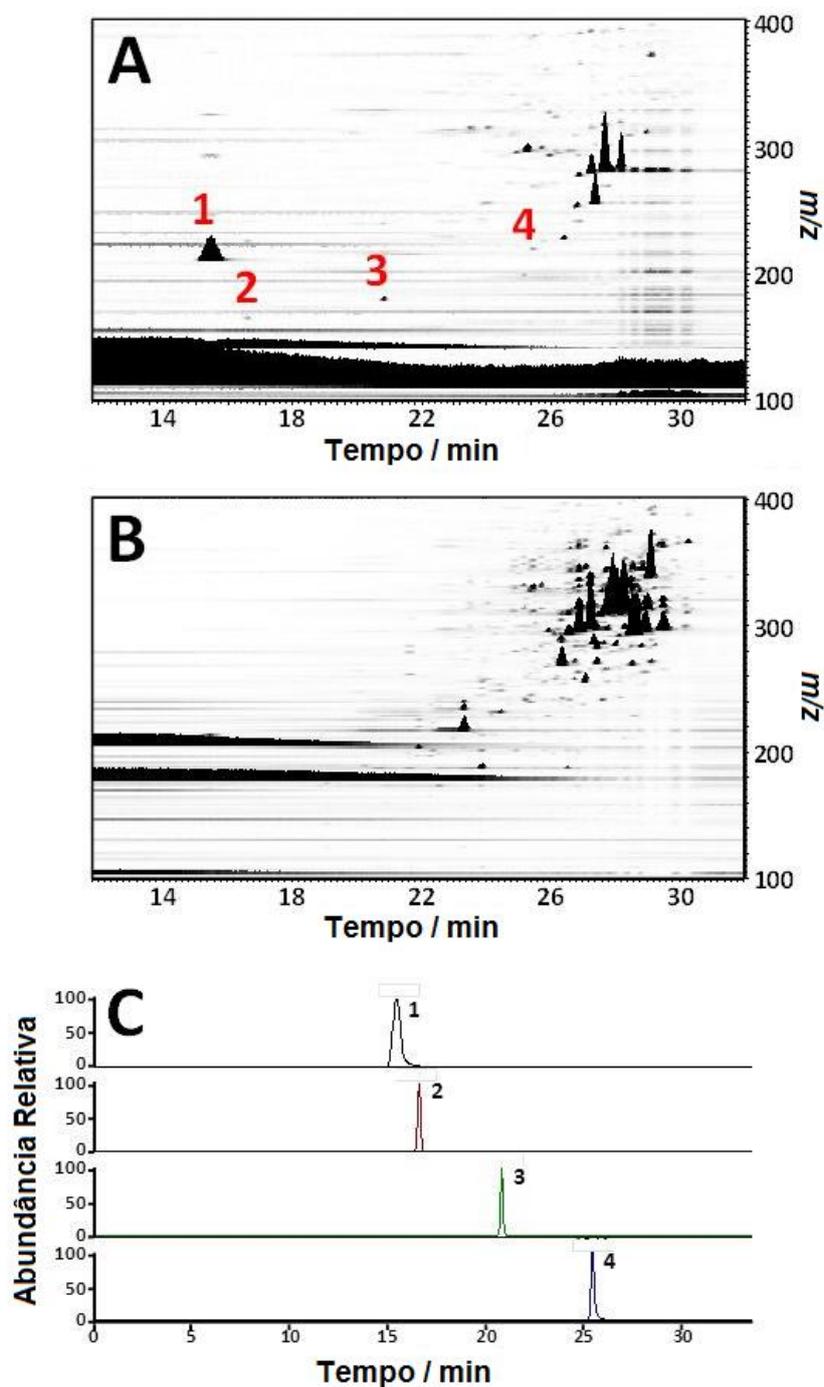
LWR: faixa de trabalho linear; r: coeficiente de correlação; LD: limite de detecção.

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que as curvas de calibração para a determinação simultânea de BHA, BHT, TBHQ e PG em amostras de biodiesel apresentam boa linearidade e sensibilidade, como indicado pelos valores dos coeficientes de correlação e limites de detecção. Esses foram obtidos nos comprimentos de onda de 290, 280, 290 e 270 nm para BHA, BHT, TBHQ e PG, respectivamente, os quais foram identificados a partir das menores concentrações dos antioxidantes nas amostras analisadas.

#### 4.2.3 Análise por UHPLC-ESI-Orbitrap/MS

A Figura 71 apresenta o mapa de íons referentes à análise por UHPLC-ESI-Orbitrap/MS, no qual valores de  $m/z$  são plotados contra o tempo de retenção do analito; na presente técnica, foi possível reduzir a interferência de fundo no modo negativo.

Apesar de terem sido empregadas a mesma coluna e condições de fase móvel usadas em HPLC-UV, o fluxo foi diminuído para 0,3 mL min<sup>-1</sup>, o que resultou em um maior tempo de retenção observado na análise por MS. O baixo fluxo é necessário para facilitar a formação do spray na análise em ESI-MS.



**Figura 71.** Mapa de íons obtido por UHPLC-ESI-Orbitrap/MS na análise de biodiesel fortificado com PG, TBHQ, BHA e BHT ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  cada) nos modos (A) Negativo e (B) Positivo, com (C) Correspondentes cromatogramas de íons extraídos para os quatro antioxidantes: (1) PG, (2) TBHQ, (3) BHA, (4) BHT. Coluna Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical  $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm i.d.} \times 5 \mu\text{m}$  partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 17 minutos) com aumento linear até 100% v/v, mantendo-se por 13 minutos; equilíbrio a 50% v/v de B por 5 minutos antes da injeção seguinte. Amostras ( $15 \mu\text{L}$ ) injetadas em um fluxo de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ . Fonte HESI operada nos modos positivo e negativo: gás de bainha 35, gás auxiliar 10, gás de varredura 0, voltagem do spray 3,0 kV, temperatura do capilar  $320 \text{ }^\circ\text{C}$  e do aquecedor do gás auxiliar  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ . MS operado nos modos positivo e negativo em *full scan* (de 50 a  $400 \text{ m/z}$ ): resolução de 70 000 FWHM, alvo AGC de  $1 \times 10^6$  e tempo máximo de injeção de 200 ms.

Além dos quatro antioxidantes, o teor de FAMES no biodiesel pode ser detectado. A quantidade de picos referentes aos FAMES é muito menor no modo negativo do que no modo positivo, como se pode ver nas Figuras 71A e 71B, respectivamente. No modo positivo, os íons moleculares protonados foram identificados e são apresentados na Tabela 6, com o mapa de íons ilustrado na Figura 71B. Uma vez que quanto maior a hidrofobicidade de um composto mais fortemente esse é retido na fase hidrofóbica, os FAMES com maiores valores de  $m/z$  tem tempo de eluição tardio (ver topo direito da Figura 71B); os FAMES saturados (mais hidrofóbicos) eluem em tempo maior do que os insaturados de massa molar semelhante (ver Tabela 6). Tais comportamentos são indícios de uma característica típica de separação em fase reversa.<sup>158</sup>

**Tabela 6.** Perfil analítico do biodiesel por UHPLC-ESI-Orbitrap/MS.

No.	Tempo de retenção (min)	Massa exata [M+H] <sup>+</sup> ou [M-H] <sup>-</sup>	Composto
1	15,5	211,0607 <sup>a</sup>	PG <sup>b</sup>
2	16,7	165,0916 <sup>a</sup>	TBHQ <sup>b</sup>
3	20,8	179,1072 <sup>a</sup>	BHA <sup>b</sup>
4	25,4	219,1749 <sup>a</sup>	BHT <sup>b</sup>
5	25,2; 27,6 <sup>c</sup>	241,2169	FAME C14:0
6	25,8; 27,8 <sup>c</sup>	255,2325	FAME C15:1
7	26,4; 28,6 <sup>c</sup>	269,2481	FAME C16:0
8	26,6; 28,2 <sup>c</sup>	291,2324	FAME C18:4
9	26,6; 28,5 <sup>c</sup>	293,2480	FAME C18:3
10	26,9; 29,0 <sup>c</sup>	295,2637	FAME C18:2
11	27,2; 29,5 <sup>c</sup>	297,2794	FAME C18:1
12	30,2	299,2949	FAME C18:0
13	29,6	321,2795	FAME C20:3
14	27,7; 30,0 <sup>c</sup>	323,2951	FAME C20:2
15	28,0; 30,6 <sup>c</sup>	325,3107	FAME C20:1
16	30,2; 31,5 <sup>c</sup>	327,3263	FAME C20:0
17	32,1	341,3419	FAME C21:0

<sup>a</sup> Valores de massa calculados no modo negativo.

<sup>b</sup> Identidade do composto também confirmada por meio de sua injeção individual.

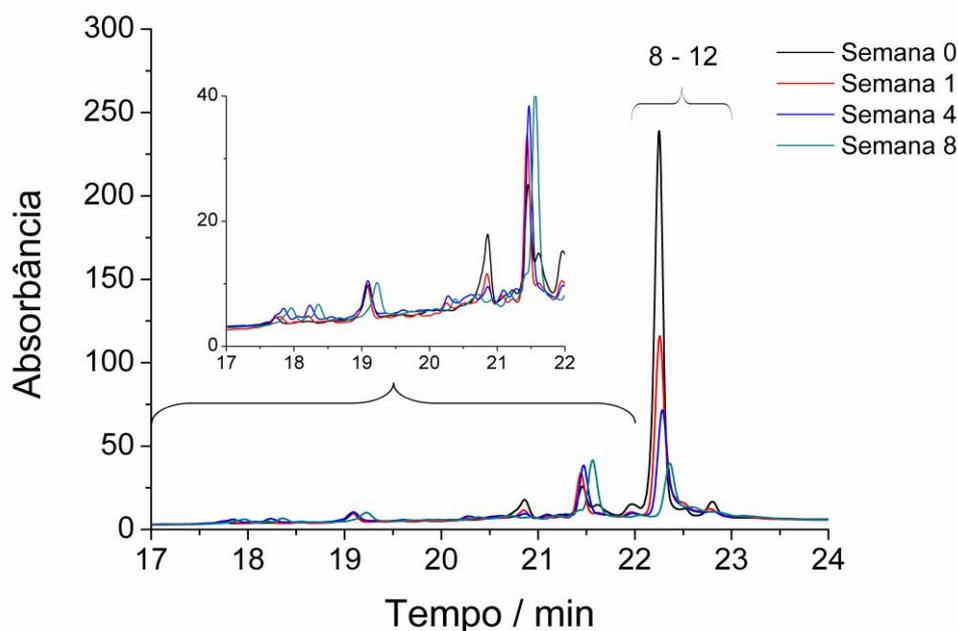
<sup>c</sup> Identificação do composto com mais de um pico para um valor exato de massa, indicativo da presença de isômeros.

#### 4.2.4 Avaliação da Estabilidade do Biodiesel

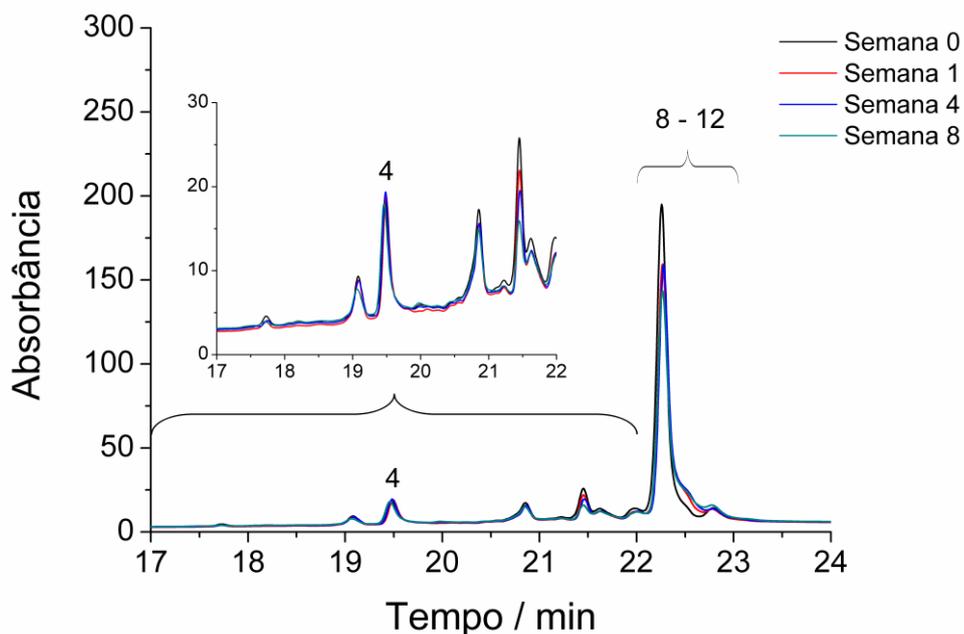
A estabilidade de componentes do biodiesel de óleo residual de fritura (não aditivado, comercial e fortificado) sob exposição à luz solar e temperatura ambiente foi investigada, por meio de degradação oxidativa forçada.

Os cromatogramas sobrepostos a diferentes tempos de exposição (0, 1, 4 e 8 semanas) para amostras de biodiesel sem antioxidantes, fortificado com os quatro antioxidantes e amostra comercial fortificada com BHT são apresentados nas Figuras 72, 73 e 74, respectivamente. Sem a presença de antioxidantes, o teor de FAMES C18 no biodiesel diminuiu significativamente na primeira semana de exposição e continuou diminuindo ao longo das 8 semanas de exposição, como mostrado na Figura 75A.

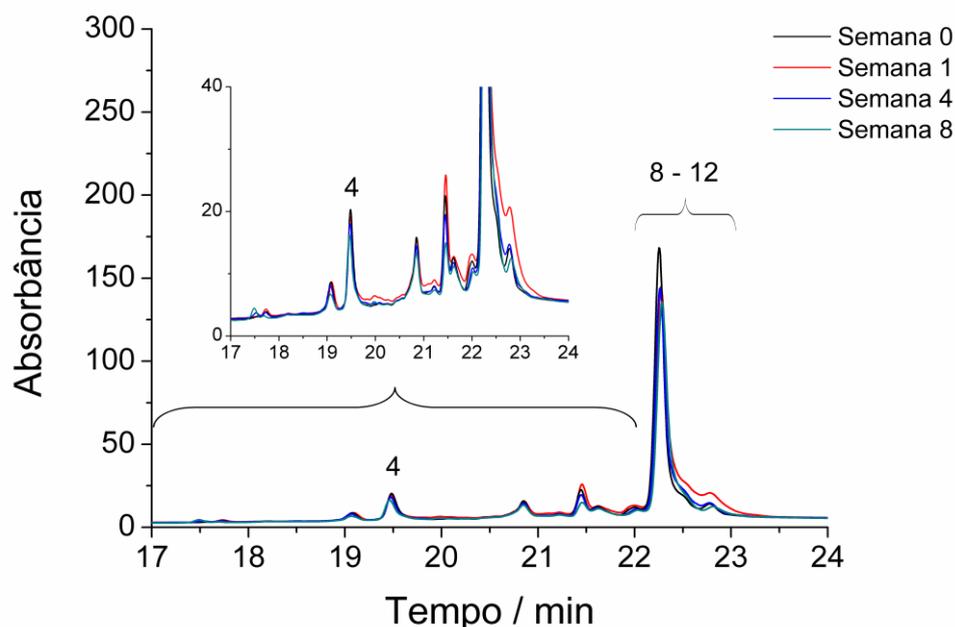
Para as amostras contendo antioxidantes, o teor dos FAMES das semanas 4 - 8 não apresentou queda significativa quando comparado com o ensaio correspondente à semana 0, nem houve degradação relevante dos antioxidantes, *e.g.* como ilustrado para o BHT (pico 4 nas Figuras 73 e 74, com teor plotado na Figura 75B) e outros antioxidantes (Figura 75C).



**Figura 72.** Cromatogramas por HPLC-UV de amostra de biodiesel sem adição de antioxidantes, ao longo de 8 semanas: (8 - 12) FAMES mostrados na Tabela 6. Coluna Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 μm partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 17 min) com aumento linear até 100% v/v, mantendo-se por 13 min; equilíbrio a 50% v/v de B por 5 min antes da injeção seguinte. Amostras (5 μL) injetadas em fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, previamente diluídas 20 vezes em metanol v/v. Comprimento de onda de 280 nm.

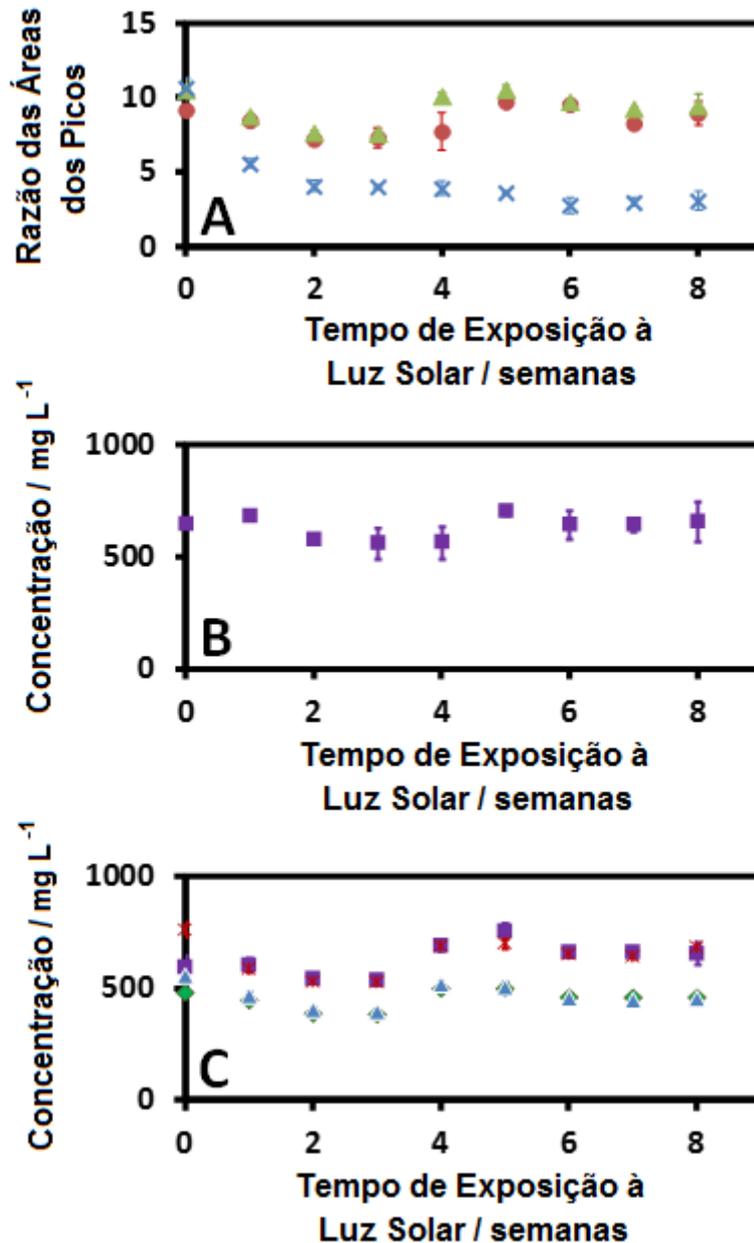


**Figura 73.** Cromatogramas por HPLC-UV de amostra de biodiesel com adição de BHA, BHT, TBHQ e PG (700 ppm cada), ao longo de 8 semanas: (4) BHT, (8 - 12) FAMES mostrados na Tabela 6. Coluna Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 µm partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 17 min) com aumento linear até 100% v/v, mantendo-se por 13 min; equilíbrio a 50% v/v de B por 5 min antes da injeção seguinte. Amostras (5 µL) injetadas em um fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, previamente diluídas 20 vezes em metanol v/v. Comprimento de onda de 280 nm.



**Figura 74.** Cromatogramas por HPLC-UV de amostra de biodiesel comercial com adição de BHT (600 - 800 ppm, conforme fabricante), ao longo de 8 semanas: (4) BHT, (8 - 12) FAMES mostrados na Tabela 6. Coluna Zorbax SB-Phenyl (StableBond Analytical 250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 µm partícula); gradiente de eluição inicial 50% v/v (fase móvel B por 17 min) com aumento linear até 100% v/v, mantendo-se por 13 min; equilíbrio a 50% v/v de B por 5 min antes da injeção seguinte. Amostras (5 µL) injetadas em um fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, previamente diluídas 20 vezes em metanol v/v. Comprimento de onda de 280 nm.

A Figura 75 mostra a relação entre o tempo de exposição e a estabilidade dos FAMES na presença e ausência de antioxidantes no biocombustível, evidenciando que, mesmo em condições desfavoráveis como a exposição à luz solar, a adição do antioxidante mantém os teores dos ésteres mais elevados.



**Figura 75.** Perfil de estabilidade química de diferentes amostras de biodiesel após exposição à luz solar por até 8 semanas: (A) Teor total de FAME C18 (compostos 8 - 12 na Tabela 6) no biodiesel puro (×), amostra comercial fortificada com BHT (o) e amostra fortificada com os quatro antioxidantes (Δ); (B) Teor total de BHT em amostra comercial de biodiesel (□); (C) Teores de (◇) PG, (Δ) TBHQ, (\*) BHA e (□) BHT em amostras de biodiesel fortificadas com os quatro antioxidantes. As barras de erro foram obtidas a partir de três replicatas dos experimentos.

## 5. CONCLUSÕES

Na determinação simultânea de TBHQ e PG em meio biodiesel:etanol por voltametria de pulso diferencial usando um eletrodo de Pt, a separação de 250 mV entre os potenciais de oxidação permitiu a identificação e quantificação simultânea dos dois antioxidantes empregando um procedimento matemático de deconvolução dos voltamogramas. Sensibilidade analítica da ordem de  $10^{-8}$  A L mol<sup>-1</sup> e valores de ensaio de recuperação de 116% para TBHQ e 104% para PG foram obtidos, o que indica boa precisão e exatidão. O deslocamento do potencial de oxidação para valores mais positivos com concentrações crescentes de antioxidante indicou maior grau de irreversibilidade na oxidação do PG do que na do TBHQ.

A microemulsão A/O contendo 71% *n*-propanol, 11% água e 18% biodiesel foi caracterizada e evidenciou ser um meio solvente adequado para a realização de análise direta de antioxidantes fenólicos sintéticos em biodiesel por voltametria de pulso diferencial. No entanto, ensaios preliminares empregando um microeletrodo de fibra de carbono indicaram que este material é quimicamente ativo em relação aos compostos estudados, o que dificulta sua limpeza e, conseqüentemente, a reprodutibilidade dos resultados.

Na identificação e determinação simultânea de TBHQ e BHT em microemulsão de biodiesel livre de surfactante por voltametria de pulso diferencial em eletrodo de Au observou-se apresentou uma separação entre os potenciais de pico de 270 mV com sensibilidade analítica de  $10^{-7}$  A L mol<sup>-1</sup>. Valores dos ensaios de recuperação de 90% para o TBHQ e de 99,5% para o BHT foram obtidos pela técnica de adição de padrão por deconvolução dos voltamogramas. A menor sensibilidade analítica em relação ao meio etanol pode ser atribuída a um menor grau de atividade catalítica do eletrodo de Au em relação ao de Pt. Neste caso, não foi observado deslocamento do potencial de oxidação para valores mais positivos com concentrações crescentes de antioxidante, indicando maior grau de reversibilidade das reações neste meio.

Em razão da seletividade dos potenciais de oxidação dos compostos investigados, ambos os meios, etanol e SFME, podem ser empregados na determinação direta de antioxidantes em biodiesel, sem a necessidade de pré-tratamento da amostra. No entanto, como os materiais eletródicos empregados são diferentes, não é possível atribuir vantagens significativas de um sobre o outro.

Entre as técnicas cromatográficas empregadas, GC/qMS e HPLC-UV, a segunda permitiu separar, detectar e quantificar simultaneamente BHT, BHA, TBHQ e PG, sem a necessidade de extração ou derivatização, com boa linearidade nas curvas de calibração e baixos limites de detecção. Já por GC/qMS foram detectados TBHQ, BHT e BHA em meio biodiesel:metanol 1:50, não sendo detectado o PG.

As curvas de calibração nas análises por HPLC-UV empregando diluição do biodiesel em metanol e coluna fenólica apresentaram linearidade na faixa de concentrações entre 10 e 80 mg L<sup>-1</sup>, com coeficientes de correlação variando entre 0,99855 e 0,99949 enquanto para as análises por GC/qMS a linearidade ficou na faixa de concentrações entre 5 e 25 mg L<sup>-1</sup>, com coeficientes de correlação variando entre 0,9868 e 0,9988. A estabilidade química do biodiesel sob exposição à luz solar e temperatura ambiente, com e sem adição de antioxidante, mostrou que a presença simultânea dos 4 antioxidantes investigados manteve o conteúdo de FAMES praticamente constante durante 8 semanas.

A técnica UHPLC-ESI-Orbitrap/MS permitiu a identificação dos antioxidantes e dos alquil ésteres de ácidos graxos presentes na amostra de biodiesel não aditivado na planta, empregando as mesmas coluna e fase móvel das análises por HPLC-UV.

Os métodos cromatográficos desenvolvidos mostram-se aplicáveis em análises de rotina em amostras comerciais de biodiesel e na investigação da estabilidade do biocombustível sob armazenamento à temperatura ambiente.

As metodologias propostas são de fácil preparo e baixo consumo de amostra, podendo vir a serem do interesse da indústria para o monitoramento destes e de outros antioxidantes em biodiesel, na linha de produção. A principal vantagem é não ser necessário nenhum tipo de pré-tratamento da amostra: a simples diluição em metanol ou etanol ou a preparação do biodiesel na forma de microemulsão livre de surfactante conferem rapidez e simplicidade à determinação dos antioxidantes investigados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Datta, A.; Mandal, B.K. *Renew Sust Energ Rev* **2016**, *57*, 799.
2. Paulo, A.A.d.; Costa, R.S.d.; Rahde, S.B.; Vecchia, F.D.; Seferin, M.; Santos, C.A.d. *Appl Therm Eng* **2016**, *98*, 288.
3. Yaakob, Z.; Narayanan, B.N.; Padikkaparambil, S.; Unni, S.; Akbar, M. *Renew Sust Energ Rev* **2014**, *35*, 136.
4. ANP. Produção de Biocombustíveis Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/producao-de-biocombustiveis>>. Acesso em 08/11/2016.
5. Pinto, A.C.; Guarieiro, L.L.N.; Rezende, M.J.C.; Ribeiro, N.M.; Torres, E.A.; Lopes, W.A.; Pereira, P.A.d.P.; Andrade, J.B.d. *J Braz Chem Soc* **2005**, *16*(6B), 1313.
6. Fu, J.; Turn, S.Q.; Takushi, B.M.; Kawamata, C.L. *Fuel* **2016**, *167*, 89.
7. Tormin, T.F.; Gimenes, D.T.; Richter, E.M.; Munoz, R.A.A. *Talanta* **2011**, *85*, 1274.
8. Takemoto, E.; Filho, J.T.; Godoy, H.T. *Quim Nova* **2009**, *32*(5), 1189.
9. Rashed, M.M.; Kalam, M.A.; Masjuki, H.H.; Rashedul, H.K.; Ashraful, A.M.; Shancita, I.; Ruhul, A.M. *RSC Adv* **2015**, *5*, 36240.
10. Conant, J.B.; Kahn, H.M.; Fieser, L.F.; Jr, S.S.K. *J Am Chem Soc* **1922**, *44*, 1382.
11. Fieser, L.F. *J Am Chem Soc* **1930**, *52*, 5204.
12. Conant, J.B.; Fieser, L.F. *J Am Chem Soc* **1924**, *46*, 1858.
13. Julian, D.B.; Ruby, W.R. *J Am Chem Soc* **1950**, *72*, 4719.
14. Hedenburg, J.F.; Freiser, H. *Anal Chem* **1953**, *25*, 13551358.
15. Cortés, A.G.; García, A.J.R.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J.M. *Anal Chim Acta* **1993**, *273*, 545.
16. Surareungchai, W.; Kasiwat, D. *Electroanal* **2000**, *12*(14), 1124.
17. Thomas, A.; Vikraman, A.E.; Thomas, D.; Kumar, K.G. *Food Anal Method* **2015**, *8*, 20282034.
18. Zhao, P.; Hao, J. *Food Chem* **2013**, *139*, 1001.
19. Oliveira, T.R.d.; Grawe, G.F.; Mocolini, S.K.; Terezo, A.J.; Castilho, M. *Analyst* **2014**, *139*, 2214.
20. Ceballos, C.; Fernández, H. *Food Res Int* **2000**, *33*, 357.
21. Wang, Z.; Yang, F.; Zheng, H.; Qin, X.; Luo, J.; Li, Y.; Xiao, D. *Analyst* **2014**, *139*, 3622.

22. Tomášková, M.t.; Chýlková, J.; Navrátil, T.s.; Šelešovská, R.t. *Energ Fuel* **2014**, *28*, 4731–4736.
23. Goulart, L.A.; Teixeira, A.R.L.; Ramalho, D.A.; Terezo, A.J.; Castilho, M. *Fuel* **2014**, *115*, 126.
24. Chýlková, J.; Tomášková, M.; Mikysek, T.; Šelešovská, R.; Jehlička, J. *Electroanal* **2012**, *24*(6), 1374.
25. Ding, M.; Zou, J. *Food Chem* **2012**, *131*, 1051.
26. Guo, L.; Xie, M.-Y.; Yan, A.-P.; Wan, Y.-Q.; Wu, Y.-M. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *386*, 1881.
27. Webster, R.e.L.; Rawson, P.M.; Evans, D.J.; Marriott, P.J. *Energ Fuel* **2014**, *28*, 1097–1102.
28. Liu, C.; Wang, J.; Yang, Y. *Anal Methods* **2014**, *6*, 6038.
29. Li, J.; Bi, Y.; Liu, W.; Sun, S. *J Agr Food Chem* **2015**, *63*, 8584.
30. ANP. Biodiesel. Disponível em:  
<<http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis/biodiesel>>. Acesso em 22/11/2016.
31. ANP. Boletim Mensal do Biodiesel. Disponível em:  
<[http://www.anp.gov.br/wwwanp/images/publicacoes/boletins-anp/Boletim\\_Mensal\\_do\\_Biodiesel/BoletimBiodiesel\\_OUT2016.pdf](http://www.anp.gov.br/wwwanp/images/publicacoes/boletins-anp/Boletim_Mensal_do_Biodiesel/BoletimBiodiesel_OUT2016.pdf)>. Acesso em 22/11/2016.
32. Almeida, E.S.; Portela, F.M.; Sousa, R.M.F.; Daniel, D.; Terrones, M.G.H.; Richter, E.M.; Muñoz, R.A.A. *Fuel* **2011**, *90*, 3480.
33. Borsato, D.; Cini, J.R.d.M.; Silva, H.C.d.; Coppo, R.L.; Angilelli, K.G.; Moreira, I.; Maia, E.C.R. *Fuel Process Technol* **2014**, *127*, 111.
34. Gomes, A.F.; Gomes, M.P.S.; Souza, L.D.; Costa, M. *J Therm Anal Calorim* **2015**, *119*, 1861.
35. Fernandes, D.M.; Serqueira, D.S.; Portela, F.M.; Assunção, R.M.N.; Munoz, R.A.A.; Terrones, M.G.H. *Fuel* **2012**, *97*, 658.
36. Filho, L.C.G.; Micke, G.A. *J Chromatogr A* **2007**, *1154*, 477.
37. Neto, P.R.C.; Rossi, L.F.S.; Zagonel, G.F.; Ramos, L.P. *Quim Nova* **2000**, *23*(4), 531.
38. Pullen, J.; Saeed, K. *Energy* **2014**, *72*, 1.
39. Balat, M.; Balat, H. *Energ Convers Manage* **2008**, *49*, 2727.
40. Batista, L.d.N.; Silva, V.F.D.; Pissurno, É.C.G.; Soares, T.d.C.; Jesus, M.R.d.; Kunigami, C.N.; Brasil, M.G.; Fonseca, M.G.d. *Environ Chem Lett* **2015**, *13*(3), 353.

41. Guzatto, R. *Otimização da metodologia TDSP para produção de biodiesel e projeto de planta piloto*. Dissertação de Mestrado **2010**, UFRGS: Porto Alegre/RS - Brasil.
42. Ng, J.-H.; Ng, H.K.; Gan, S. *Clean Technol Envir* **2010**, *12*, 213.
43. Santos, N.A.; Cordeiro, A.M.T.M.; Damasceno, S.S.; Aguiar, R.T.; Rosenhaim, R.; Filho, J.R.C.; Santos, I.M.G.; Maia, A.S.; Souza, A.G. *Fuel* **2012**, *97*, 638.
44. Lôbo, I.P.; Ferreira, S.L.C.; Cruz, R.S.d. *Quim Nova* **2009**, *32*(6), 1596.
45. Focke, W.W.; Westhuizen, I.v.d.; Grobler, A.B.L.; Nshoane, K.T.; Reddy, J.K.; Luyt, A.S. *Fuel* **2012**, *94*, 227.
46. Domingos, A.K.; Saad, E.B.; Vechiatto, W.W.D.; Wilhelm, H.M.; Ramos, L.P. *J Braz Chem Soc* **2007**, *18*(2), 416.
47. Maia, E.C.R.; Borsato, D.; Moreira, I.; Spacino, K.R.; Rodrigues, P.R.P.; Gallina, A.L. *Fuel Process Technol* **2011**, *92*, 1750.
48. Karavalakis, G.; Hilari, D.; Givalou, L.; Karonis, D.; Stournas, S. *Energy* **2011**, *36*, 369.
49. Silva, Y.P.d. *Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para quantificação de antioxidantes em biodiesel de soja*. Tese de Doutorado **2014**, UFRGS: Porto Alegre/RS - Brasil.
50. Ramalho, V.C.; Jorge, N. *Quim Nova* **2006**, *29*(4), 755.
51. Pullen, J.; Saeed, K. *Fuel Process Technol* **2014**, *125*, 223.
52. Frankel, E.N. *Prog Lipid Res* **1980**, *19*, 1.
53. Plessis, L.M.d.; Villiers, J.B.M.d.; Walt, W.H.v.d. *J Am Oil Chem Soc* **1985**, *62*(4), 748.
54. Dunn, R.O. *Biofuel Bioprod Bior* **2008**, *2*, 304.
55. Tagliabue, S.; Gasparoli, A.; Bella, L.d.; Bondioli, P. *Riv Ital Sostanze Gr* **2004**, *LXXXI*, 37.
56. Jamshidian, M.; Tehrani, E.A.; Cleymand, F.; Leconte, S.; Falher, T.; Desobry, S. *Carbohydr Polym* **2012**, *87*, 1763.
57. Tavares, M.F.M. *Quim Nova* **1997**, *20*(5), 493.
58. Morales, V.; Goren, A.C.; Held, A.; Bilsel, M.; Gündüz, S.; Yilmaz, H. *Accredit Qual Assur* **2015**, *20*, 411.
59. Musharraf, S.G.; Ahmed, M.A.; Zehra, N. *Anal Methods* **2015**, *7*, 3372.
60. Abad, S.; Pérez, X.; Planas, A.; Turon, X. *Talanta* **2014**, *121*, 210.
61. Ahmed, M.A.; Khan, I.; Hashim, J.; Musharraf, S.G. *Anal Methods* **2015**, *7*, 7805.
62. Hoar, T.P.; Schulman, J.H. *Nature* **1943**, *152*, 102.

63. Damasceno, B.P.G.L.; Silva, J.A.; Oliveira, E.E.; Silveira, W.L.L.; Araújo, I.B.; Oliveira, A.G.; Egito, E.S.T. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* **2011**, 32(1), 9.
64. Ryan, R.; Donegan, S.; Power, J.; Altria, K. *Electrophoresis* **2010**, 31, 755.
65. Wennerström, H.; Söderman, O.; Olsson, U.; Lindman, B. *Colloid Surface A* **1997**, 123, 13.
66. Hellweg, T. *Curr Opin Colloid In* **2002**, 7, 50.
67. Oliveira, A.G.d.; Scarpa, M.V.; Correa, M.A.; Cera, L.F.R.; Formariz, T.P. *Quim Nova* **2004**, 27(1), 131.
68. Mendonça, C.R.B.; Bica, C.I.D.; Piatnicki, C.M.S. *J Braz Chem Soc* **2003**, 14(4), 628.
69. Boso, R.L.; Bellini, M.S.; Mikšik, I.; Deyl, Z. *J Chromatogr A* **1995**, 709, 11.
70. Bumajdad, A.; Eastoe, J. *J Colloid Interf Sci* **2004**, 274, 268.
71. Winsor, P.A. *T Faraday Soc* **1948**, 44, 376.
72. Klier, J.; Tucker, C.J.; Kalantar, T.H.; Green, D.P. *Adv Mater* **2000**, 12(23), 1751.
73. Moulik, S.P.; Paul, B.K. *Adv Colloid Interfac* **1998**, 78, 99.
74. Mendonça, C.R.B. *Desenvolvimento de metodologias para análise direta de óleos vegetais empregando microemulsões de água em óleo e meios não aquosos*. Tese de Doutorado **2005**, UFRGS: Porto Alegre/RS - Brasil.
75. Xu, J.; Yin, A.; Zhao, J.; Li, D.; Hou, W. *J Phys Chem B* **2013**, 117, 450.
76. Mendonça, C.R.B.; Bica, C.I.D.; Simó-Alfonso, E.F.; Ramis-Ramos, G.; Piatnicki, C.M.S. *J Braz Chem Soc* **2008**, 19(4), 775.
77. Silva, Y.P.d.; Dalmoro, V.; Ruiz, Y.P.M.; Capeletti, L.B.; Mendonça, C.R.B.; Santos, J.H.Z.d.; Piatnicki, C.M.S. *Anal Methods* **2014**, 6, 9212.
78. Hou, W.; Xu, J. *Curr Opin Colloid In* **2016**, 25, 67.
79. Smith, G.D.; Donelan, C.E.; Barden, R.E. *J Colloid Interf Sci* **1977**, 60(3), 488.
80. Song, F.; Xu, J.; Hou, W.G. *Chinese Chem Lett* **2010**, 21, 880.
81. Subbarao, C.V.; Chakravarthy, I.P.K.; Bharadwaj, A.V.S.L.S.; Prasad, K.M.M.K. *Chem Eng Technol* **2012**, 35(2), 225.
82. Mohorič, U.; Beutner, A.; Krickl, S.; Touraud, D.; Kunz, W.; Matysik, F.-M. *Anal Bioanal Chem* **2016**, 408, 8681.
83. Vitale, S.A.; Katz, J.L. *Langmuir* **2003**, 19, 4105.
84. Solans, C.; Morales, D.; Homs, M. *Curr Opin Colloid In* **2016**, 22, 88.

85. Klossek, M.L.; Touraud, D.; Zemb, T.; Kunz, W. *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 4116.
86. Jiang, T.-F.; Liang, T.-T.; Yue, M.-E.; Wang, Y.-H.; Lv, Z.-H. *Food Anal Method* **2016**, *9*, 7.
87. Madadlou, A.; Jaberipour, S.; Eskandari, M.H. *LWT-Food Sci Technol* **2014**, *57*, 725.
88. Ni, P.; Hou, W.-G. *Chinese J Chem* **2008**, *26*, 1985.
89. Xu, J.; Zhang, L.; Li, D.; Zhao, J.; Hou, W. *Colloid Polym Sci* **2013**, *291*, 2515.
90. Kayali, I.; Jyothi, C.K.; Qamhie, K.; Olsson, U. *J Colloid Interf Sci* **2016**, *463*, 173.
91. Bora, P.; Konwar, L.J.; Phukan, M.M.; Deka, D.; Konwar, B.K. *Fuel* **2015**, *157*, 208.
92. Gomes, S.M.d.C. *Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica*. Dissertação de Mestrado **2010**, Universidade de Coimbra: Coimbra - Portugal.
93. Abidin, S.Z.; Patel, D.; Saha, B. *Can J Chem Eng* **2013**, *91*, 1896.
94. Marriott, P.J.; Chin, S.-T.; Maikhunthod, B.; Schmarr, H.-G.; Bieri, S. *TrAC-Trend Anal Chem* **2012**, *34*, 1.
95. Okullo, A.; Ogwok, P.; Temu, A.K.; Ntalikwa, J.W. *Adv Mat Res* **2013**, *824*, 436.
96. Hirschegger, L.; Schober, S.; Mittelbach, M. *Eur J Lipid Sci Technol* **2014**, *116*(1), 89.
97. Nolvachai, Y.; Marriott, P.J. *J Sep Sci* **2013**, *36*(1), 20.
98. Gao, X.; Williams, S.J.; Woodman, O.L.; Marriott, P.J. *J Chromatogr A* **2010**, *1217*(52), 8317.
99. Soares, R.D. *Estudo do perfil cromatográfico dos componentes voláteis do vinho espumante Moscatel através do emprego de micro extração em fase sólida e cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente*. Dissertação de Mestrado **2012**, UFRGS: Porto Alegre/RS - Brasil.
100. Xu, S.; Chen, F.; Deng, M.; Sui, Y. *Luminescence* **2014**, *29*(8), 1027.
101. Galimany-Rovira, F.; Pérez-Lozano, P.; Suñe-Negre, J.M.; García-Montoya, E.; Miñarro, M.; Tico, J.R. *Anal Methods* **2016**, *8*, 1170.
102. Holčápek, M.; Jandera, P.; Fischer, J.; Prokeš, B. *J Chromatogr A* **1999**, *858*(1), 13.
103. Porto, H.S.M. *HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos*. Dissertação de Mestrado **2014**, Universidade de Coimbra: Coimbra - Portugal.
104. Redruello, B.; Ladero, V.; Rio, B.d.; Fernández, M.; Martín, M.C.; Alvarez, M.A. *Food Chem* **2017**, *217*, 117.

105. Jin, H.; Liu, Y.; Guo, Z.; Wang, J.; Zhang, X.; Wang, C.; Liang, X. *J Pharmaceut Biomed* **2016**, *130*, 336.
106. Pyrzynska, K.; Sentkowska, A. *CRC-Cr Rev Anal Chem* **2015**, *45*, 41.
107. Mahmoodani, F.; Perera, C.O.; Fedrizzi, B.; Abernethy, G.; Chen, H. *Food Chem* **2017**, *219*, 373.
108. Richter, E.M.; Lago, C.L.d.; Angnes, L. *Quim Nova* **2006**, *29*(4), 862.
109. Crespi, F. *Anal Biochem* **1991**, *194*, 69.
110. Wang, Y.X.; Ni, Y.N.; Kokot, S. *Chinese Chem Lett* **2010**, *21*, 963.
111. Streeter, I.; Wildgoose, G.G.; Shao, L.; Compton, R.G. *Sensor Actuat B-Chemical* **2008**, *133*, 462.
112. Souza, D.d.; Machado, S.A.S.; Avaca, L.A. *Quim Nova* **2003**, *26*(1), 81.
113. Fleischmann, M.; Pons, S.; Rolison, D.R.; Schmidt, P.P., *Ultramicroelectrodes*. **1987**, Morganton: Datatech Systems, Inc.
114. Brett, C.M.A.; Brett, A.M.O., *Electrochemistry: principles, methods, and applications*. **1993**, New York: Oxford University Press.
115. Carvalho, R.M.d.; Kubota, L.T.; Rohwedder, J.J. *Quim Nova* **1999**, *22*(4), 591.
116. Edmonds, T.E. *Anal Chim Acta* **1985**, *175*, 1.
117. Golas, J.; Osteryoung, J. *Anal Chim Acta* **1987**, *192*, 225.
118. Bai, J.; Wu, L.; Wang, X.; Zhang, H.-M. *Electrochim Acta* **2015**, *185*, 142.
119. Jennings, V.J.; Dodson, A.; Eastman, R.J. *Anal Chim Acta* **1975**, *76*(1), 143.
120. Armstrong-James, M.; Millar, J. *J Neurosci Meth* **1979**, *1*, 279.
121. Cespuglio, R.; Faradji, H.; Ponchon, J.L.; Buda, M.; Riou, F.; Gonon, F.; Pujol, J.F.; Jouvot, M. *Brain Res* **1981**, *223*, 287.
122. Cheng, H.; Wang, X.; Wei, H. *Anal Chem* **2015**, *87*, 8889–8895.
123. Yu, Y.; Shamsi, M.H.; Krastev, D.L.; Dryden, M.D.M.; Leungb, Y.; Wheeler, A.R. *Lab Chip* **2016**, *16*, 543.
124. Yang, C.; Jacobs, C.B.; Nguyen, M.D.; Ganesana, M.; Zestos, A.G.; Ivanov, I.N.; Puretzky, A.A.; Rouleau, C.M.; Geohegan, D.B.; Venton, B.J. *Anal Chem* **2016**, *88*, 645–652.
125. Rees, H.R.; Anderson, S.E.; Privman, E.; Bau, H.H.; Venton, B.J. *Anal Chem* **2015**, *87*, 3849.
126. Yang, Y.; Ibrahim, A.A.; Stockdill, J.L.; Hashemi, P. *Anal Methods* **2015**, *7*, 7352.

127. Pathirathna, P.; Samaranayake, S.; Atcherley, C.W.; Parent, K.L.; Heien, M.L.; McElmurry, S.P.; Hashemi, P. *Analyst* **2014**, *139*, 4673.
128. Peña, R.C.; Souza, A.P.R.d.; Bertotti, M. *J Electroanal Chem* **2014**, *731*, 49.
129. Hoyos-Arbeláez, J.; Vázquez, M.; Contreras-Calderón, J. *Food Chem* **2017**, *221*, 1371.
130. Araújo, T.A.d.; Barbosa, A.M.J.; Viana, L.H.; Ferreira, V.S. *Colloid Surface B* **2010**, *79*, 409.
131. Araujo, T.A.d.; Barbosa, A.M.J.; Viana, L.H.; Ferreira, V.S. *Fuel* **2011**, *90*, 707.
132. Tormin, T.F.; Cunha, R.R.; Richter, E.M.; Munoz, R.A.A. *Talanta* **2012**, *99*, 527.
133. Caramit, R.P.; Andrade, A.G.d.F.; Souza, J.B.G.d.; Araujo, T.A.d.; Viana, L.H.; Trindade, M.A.G.; Ferreira, V.S. *Fuel* **2013**, *105*, 306.
134. Caramit, R.P.; Araújo, A.S.A.; Fogliatto, D.K.; Viana, L.H.; Trindade, M.A.G.; Ferreira, V.S. *Anal Methods* **2015**, *7*, 3764.
135. Marcus, Y., *Ion Solvation*. **1985**, New York: Wiley.
136. Marcus, Y. *Chem Soc Rev* **1993**, *22*, 409.
137. Humi, H.; Belgsir, E.M.; Leger, J.M.; Lamy, C.; Lezna, R.O. *Electrochim Acta* **1994**, *39*, 407.
138. Boudenne, J.-L.; Cerclier, O.; Bianco, P. *J Electrochem Soc* **1998**, *145*, 2763.
139. Gatrell, M.; Kirk, D.W. *J Electrochem Soc* **1993**, *140*, 1534.
140. Gatrell, M.; Kirk, D.W. *J Electrochem Soc* **1993**, *140*, 903.
141. Lin, Y.C.; Kan, T.H.; Chen, J.N.; Tsai, J.C.; Ku, Y.Y.; Lin, K.W. *Tribol Trans* **2013**, *56*, 997.
142. Knothe, G.; Steidley, K.R. *Energ Fuel* **2005**, *19*, 1192.
143. Szymula, M.; Narkiewicz-Michałek, J. *J Appl Electrochem* **2006**, *36*, 455.
144. Ni, Y.; Wang, L.; Kokot, S. *Anal Chim Acta* **2000**, *412*, 185.
145. Agüí, L.; López-Huertas, M.A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J.M. *J Electroanal Chem* **1996**, *414*, 141.
146. Hammerich, O.; Speiser, B., *Organic Electrochemistry, Fifth Edition: Revised and Expanded*. **2016**, Boca Raton: CRC Press.
147. Charlot, G.; Trémillon, B., *Les réactions chimiques dans les solvants e les sels fondus*. **1963**, Paris: Éditeurs Gauthier-Villars.
148. Eicke, H.-F.; Borkovec, M.; Das-Gupta, B. *J Phys Chem* **1989**, *93*(1), 314.

149. Antalek, B.; Williams, A.J.; Texter, J. *Phys Rev E* **1996**, 54(6), R5913.
150. Moulik, S.P.; Digout, L.G.; Aylward, W.M.; Palepu, R. *Langmuir* **2000**, 16, 3101.
151. Warisnoicharoen, W.; Lansley, A.B.; Lawrence, M.J. *Int J Pharm* **2000**, 198, 7.
152. Gritzner, G.; Kûta, J. *Electrochim Acta* **1984**, 29(6), 869.
153. Georges, J.; Desmettre, S. *Electrochim Acta* **1984**, 29(4), 521.
154. MacKay, R.A. *Colloid Surface A* **1994**, 82(1), 1.
155. Bond, A.M., *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*. **1980**, New York: M. Dekker.
156. Rosen, M.J.; Kunjappu, J.T., *Surfactants and Interfacial Phenomena*. **2012**, New York: John Wiley & Sons.
157. Nollet, L.M.L., *Handbook of Food Analysis Volume 2: Residues and Other Food Component Analysis*. **2004**, New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
158. Brandão, L.F.P.; Braga, J.W.B.; Suarez, P.A.Z. *J Chromatogr A* **2012**, 1225, 150.