



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



**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ANTIOXIDANTES  
EM MICROEMULSÃO A/O DE BIODIESEL POR  
ELETROFORESE CAPILAR E VOLTAMETRIA**

**Marcella Casagrande**

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre  
Dezembro de 2012

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

**Marcella Casagrande**

**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ANTIOXIDANTES  
EM MICROEMULSÃO A/O DE BIODIESEL POR  
ELETROFORESE CAPILAR E VOLTAMETRIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Dimitrios Samios  
Orientador

Porto Alegre  
Dezembro de 2012

A presente dissertação foi realizada inteiramente pela autora, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre julho de 2010 e dezembro de 2012, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Professor Doutor Dimitrios Samios.

**Comissão Examinadora:**

Prof. Dr. Carla Rosane Barboza Mendonça

Prof. Dr. Denise Schermann Azambuja

Prof. Dr. Silvio Luis Pereira Dias

Prof. Dr. Dimitrios Samios

Marcella Casagrande

À minha família, meus  
amores incondicionais,  
Márcia, João e Vinícius.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais que, independentemente da distância, sempre me incentivaram e apoiaram, nos bons e maus momentos. Obrigada pelos abraços nas horas de chegada e partida, pelas palavras de carinho e conforto que me deram, os telefonemas, as orações. Em nenhum momento deixei de sentir falta de vocês e, ao mesmo tempo, sentir que estavam comigo. Obrigada principalmente por tudo que me ensinaram durante minha vida, que me fizeram ser quem sou hoje. Amo vocês com todo meu coração!

Ao meu irmão, de quem eu sempre senti muita falta nesse tempo, e que deixava minhas idas para casa ainda mais alegres. Obrigada pelo seu apoio e carinho, pelas conversas em casa, por sempre ter feito com que a hora da minha chegada fosse especial. Amo muito meu irmão mais querido!

Aos meus avós por todo o carinho nesses anos em que estive longe; em especial às minhas avós e madrinha, por todas as orações durante esse tempo e palavras de apoio que me davam. Aos meus familiares que torceram por mim nessa etapa; sou grata a todos.

Agradeço à minha sempre e querida amiga Andréia, que na verdade considero uma irmã, por todo o incentivo, o imenso carinho e, principalmente, por ser essa pessoa sincera e companheira; torço muito por você e sou grata por ter te conhecido. Você e sua família são muito especiais para mim!

Às companheiras e amigas de apartamento, Lígia e Núbia, que me receberam literalmente “de mala e cuia” sem nos conhecermos. Aprendi um pouco mais com as duas, e agradeço pelos momentos que tivemos, pelos risos e conversas sérias, pelas experiências partilhadas, por ter passado essa etapa da minha vida com vocês. E claro, à mais recente companheira, Lu, pelos vários momentos de descontração e convivência, que com certeza foram muito divertidos, ôxe! Muito obrigada!

Ao professor Dimitrios Samios, pela orientação e transmissão de conhecimento, pela receptividade, constante disponibilidade e atenção para comigo, pelo profissionalismo e enorme dedicação à vida acadêmica. Sou muito grata pela oportunidade que me deste.

À professora Clarisse Piatnicki, por quem tenho grande admiração e respeito, por ter me recebido tão bem quando cheguei, por todos os ensinamentos e orientação, mas acima de tudo, pela amizade e por ter sido uma mãe para mim nesse período. Meu muito obrigada pela oportunidade concedida e pelo carinho sempre presente!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química pelos ensinamentos transmitidos.

À querida amiga Yara, por quem desenvolvi um enorme respeito, carinho e admiração. Sou grata por toda a atenção e ajuda dadas por ti nesse trabalho, pela amizade, pelos bons momentos, pelo companheirismo, por ter sido uma amiga não somente dentro do laboratório, mas também fora dele. Torço muito por ti e desejo sempre o melhor. Muito obrigada!

Aos não apenas colegas, mas amigos de laboratório: Suelen (considere-se contemplada com suas estrelinhas!), Lívia, Carlos, Viviane, Stéfano, Tainá, Fabiana, Bernardo, Rodrigo, Milena e Ícaro (apesar de serem ex-K125), Fernanda, pelos bons momentos compartilhados, pelos poucos (?) momentos do café passados na “rodinha do K125” (e fora dela também!), pelos risos e brincadeiras, pela excelente convivência e, principalmente, pela amizade.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FINEP, RBTB projeto ARMAZBIOD, convênio nº 01.06.1021.00, 2006-2010.

Ao CNPq e FAPERGS, PRONEX, “Petróleo e fontes biorenováveis em cadeias produtivas do Rio Grande do Sul: capacitação e excelência em caracterização da matéria-prima ao produto final”, 2010-2014.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para minha formação e conclusão dessa dissertação.

*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”*

(Simone de Beauvoir)

# SUMÁRIO

<b>Índice de Figuras</b>	x
<b>Índice de Tabelas</b>	xiv
<b>Glossário</b>	xv
<b>Resumo</b>	xvi
<b>Abstract</b>	xvii
<b>1. Introdução.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1. Objetivos.....</b>	<b>19</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. O Biodiesel.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Microemulsões.....</b>	<b>23</b>
2.2.1. Teoria de Formação das Microemulsões.....	24
2.2.2. Diagrama de Fases.....	25
2.2.3. Tipos de Microemulsões.....	27
2.2.4. Técnicas de Caracterização de Microemulsões.....	28
<b>2.3. Eletroforese Capilar.....</b>	<b>28</b>
2.3.1. Equipamento para Eletroforese Capilar.....	29
2.3.2. Fluxo Electrosmótico.....	30
2.3.3. Efeito <i>Stacking</i> .....	31
2.3.4. Cromatografia Capilar Eletrocinética em Microemulsão.....	32
<b>2.4. Técnicas Eletroquímicas de Análise.....</b>	<b>33</b>
2.4.1. Técnicas Voltamétricas.....	33
2.4.2. Ultramicroeletrodos.....	34
<b>3. Parte Experimental.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1. Materiais.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2. Metodologia.....</b>	<b>37</b>
3.2.1. Medidas por Eletroforese Capilar.....	37
3.2.1.1. Preparo do Eletrólito de Corrida.....	37
3.2.1.2. Preparo das Microemulsões.....	38
3.2.1.3. Preparo das ME a/o Contendo Ácido Salicílico e Ácido Ftálico como Padrões Internos.....	38
3.2.2. Medidas Eletroquímicas.....	38



3.2.2.1. Voltametria de Pulso Diferencial.....	38
3.2.2.2. Voltametria Potenciodinâmica.....	39
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Técnicas Voltamétricas.....</b>	<b>40</b>
4.1.1. Análise da Variação da Concentração de TBHQ na Microemulsão.....	40
4.1.2. Análise da Variação da Concentração de TBHQ na Microemulsão em Presença de Ferroceno.....	44
4.1.3. Análise da Variação da Concentração de Ferroceno na Microemulsão em Presença de TBHQ.....	49
<b>4.2. Eletroforese Capilar.....</b>	<b>52</b>
4.2.1. Estudos de Condutividade das Microemulsões.....	52
4.2.2. Estudos do Fluxo Eletroosmótico e Separação de Solutos-Sonda.....	53
4.2.3. Determinação de TBHQ por CE em ME a/o.....	57
4.2.4. Estudos de Absorção no UV-Visível.....	75
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>77</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reação de transesterificação de triglicerídeos, onde: R = cadeia carbônica dos ácidos graxos; R' = cadeia carbônica do álcool reagente.....	20
<b>Figura 2.</b> Esquema geral do mecanismo de oxidação lipídica, onde: RH = ácido graxo insaturado; R· = radical livre; ROO· = radical peróxido; ROOH = hidroperóxido.....	22
<b>Figura 3.</b> Estruturas fenólicas dos antioxidantes sintéticos: (a) BHA; (b) BHT; (c) PG; (d) TBHQ.....	23
<b>Figura 4.</b> Diagrama de fases pseudo-ternário para uma microemulsão composta por água, óleo, surfactante e co-surfactante.....	26
<b>Figura 5.</b> (a) Titulação com fase aquosa; (b) Representação dos pontos de transparência da titulação e região do diagrama correspondente à região de microemulsão.....	27
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática: (A) ME o/a, (B) ME a/o, (C) Microemulsão bicontínua.....	27
<b>Figura 7.</b> Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.....	29
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática: (a) Estrutura química da superfície de um capilar de sílica fundida; (b) Modelo para a interface capilar/solução aquosa e fluxo eletrosmótico.....	30
<b>Figura 9.</b> Perfil do fluxo eletrosmótico (induzido por campo elétrico) comparado com o fluxo gerado por pressão, e seus respectivos efeitos nas bandas.....	31
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática do princípio de separação por MEEKC em ME o/a.....	33
<b>Figura 11.</b> (a) Ácido salicílico; (b) Ácido Ftálico; (c) Tolueno; (d) DMSO; (e) Ferroceno.....	37
<b>Figura 12.</b> Voltamogramas de pulso diferencial do TBHQ na microemulsão de biodiesel nas concentrações: (a) Branco; (b) $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c) $3,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d) $4,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (e) $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	41
<b>Figura 13.</b> Curva analítica para a microemulsão de biodiesel sem e com TBHQ nas concentrações entre $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	42

<b>Figura 14.</b> Voltamogramas potenciodinâmicos do TBHQ na microemulsão de biodiesel nas concentrações: (a) Branco; (b) $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c) $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d) $3,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (e) $4,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (f) $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	43
<b>Figura 15.</b> Curva analítica para a microemulsão de biodiesel sem e com TBHQ nas concentrações entre $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	44
<b>Figura 16.</b> Voltamogramas de pulso diferencial do TBHQ na microemulsão de biodiesel contendo ferroceno: (a) Ausência de ferroceno e TBHQ; (b) Ferroceno à $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Ferroceno à $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e TBHQ nas concentrações: (c) $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d) $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (e) $3,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (f) $4,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (g) $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	46
<b>Figura 17.</b> Curva analítica para a microemulsão de biodiesel sem e com TBHQ nas concentrações entre $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Presença de ferroceno à $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	47
<b>Figura 18.</b> Voltamogramas potenciodinâmicos da microemulsão de biodiesel: (a) Ausência de ferroceno ou TBHQ; (b) Ferroceno à $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Ferroceno à $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e TBHQ nas concentrações: (c) $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d) $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (e) $3,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (f) $4,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (g) $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	48
<b>Figura 19.</b> Curva analítica para a microemulsão de biodiesel (branco) e concentrações de TBHQ entre $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Presença de ferroceno à $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	49
<b>Figura 20.</b> Voltamogramas de pulso diferencial da microemulsão de biodiesel: (a) Ausência de TBHQ ou ferroceno; (b) TBHQ à $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; TBHQ à $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e ferroceno nas concentrações: (c) $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d) $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; (e) $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (f) $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .....	50
<b>Figura 21.</b> Voltamogramas potenciodinâmicos da microemulsão de biodiesel: (a) Ausência de TBHQ ou ferroceno; (b) TBHQ à $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; TBHQ à $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e ferroceno nas concentrações: (c) $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d) $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; (e) $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (f) $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .....	51
<b>Figura 22.</b> Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel: (a) Ausência de DMSO ou tolueno; (b) DMSO à $6,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c) DMSO à $1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e tolueno à $5,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d) Tolueno à $1,10 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e DMSO à $6,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	54

<b>Figura 23.</b> Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel: (a) Ausência e (b) Presença de biodiesel, contendo $1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de DMSO e $1,10 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de tolueno.....	56
<b>Figura 24.</b> Eletroferogramas de microemulsões sem biodiesel: (a) Ausência de padrão ou TBHQ; (b) Ácido salicílico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Ácido salicílico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e TBHQ nas concentrações: (c) $3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , (d) $6,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (e) $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	58
<b>Figura 25.</b> Eletroferogramas de microemulsões sem biodiesel contendo ácido salicílico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e TBHQ nas concentrações: (a) $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (b) $3,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c) $4,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d) $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	59
<b>Figura 26.</b> Eletroferograma da microemulsão sem biodiesel contendo ácido salicílico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e TBHQ à $1,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .....	60
<b>Figura 27.</b> Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel: (a) Branco; (b) Ácido salicílico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c) Ácido salicílico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e TBHQ à $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	61
<b>Figura 28.</b> Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel com ácido salicílico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ : (a) Ausência de TBHQ; (b) TBHQ à $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	62
<b>Figura 29.</b> Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel: (a) Branco; (b) Ácido salicílico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Ácido salicílico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e TBHQ nas concentrações: (c) $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d) $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Todas as microemulsões contendo ciclodextrina à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	63
<b>Figura 30.</b> Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel: (a) Branco; TBHQ à: (b) $6,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c) $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d) $1,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	64
<b>Figura 31.</b> Eletroferogramas das microemulsões de biodiesel na ausência de padrão interno: (a) Branco; (b) TBHQ à $1,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	65
<b>Figura 32.</b> Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel: (a) Ácido salicílico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e ácido ftálico à $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (b) Ácido salicílico à $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e ácido ftálico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	66
<b>Figura 33.</b> Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel contendo ácido salicílico e ácido ftálico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ cada: (a) BHA à $2,77 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (b) BHT à $2,27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	68

<b>Figura 34.</b> Eletroferograma da microemulsão de biodiesel com ácido salicílico e ácido ftálico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ cada, contendo BHA, BHT, PG e TBHQ à $2,77 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , $2,27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , $2,35 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.....	69
<b>Figura 35.</b> Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel contendo ácidos salicílico e ftálico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ cada e TEA: (a) PG à $2,35 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (b) TBHQ à $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	70
<b>Figura 36.</b> Ampliação da Figura 35.....	71
<b>Figura 37.</b> Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel contendo ácido salicílico e ácido ftálico à $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ cada e TEA à 5%: (a) Ausência de PG; (b) PG à $2,35 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	72
<b>Figura 38.</b> Mecanismo proposto de reação ácido-base entre o PG e a TEA.....	73
<b>Figura 39.</b> Mecanismo proposto de reação ácido-base entre o TBHQ e a TEA.....	74
<b>Figura 40.</b> Modelo proposto para superfície do capilar após contato com a microemulsão....	75
<b>Figura 41.</b> Espectros de absorção no UV-Vis da ME sem biodiesel, composta por 74% de pseudo-fase e 20% de água: (a) Branco; (b) PG à $1,17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i) PG à $1,17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e 5% de TEA, sendo os espectros obtidos no momento da adição da TEA, e em seguida em intervalos de 10 minutos cada.....	76

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela I.</b> Concentrações de TBHQ e coeficientes de correlação linear determinados em diferentes condições experimentais, conforme legenda das figuras indicadas.....	52
<b>Tabela II.</b> Condutividade elétrica das amostras analisadas por CE.....	53

## GLOSSÁRIO

BHA	Butil-hidroxi-anisol ( <i>Butylated Hydroxyanisole</i> )
BHT	Butil-hidroxi-tolueno ( <i>Butylated Hydroxytoluene</i> )
CE	Eletroforese Capilar ( <i>Capillary Electrophoresis</i> )
e.l.	Comprimento efetivo ( <i>effective length</i> )
EOF	Fluxo eletroosmótico ( <i>Electroosmotic Flow</i> )
GC	Cromatografia em Fase Gasosa ( <i>Gas Chromatography</i> )
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
i.d.	Diâmetro interno ( <i>internal diameter</i> )
ME a/o	Microemulsão de água em óleo
ME o/a	Microemulsão de óleo em água
MEEKC	Cromatografia Capilar Eletrocínética em Microemulsão ( <i>Microemulsion Electrokinetic Chromatography</i> )
MEKC	Cromatografia Eletrocínética Micelar ( <i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i> )
PCP	Fase contínua polar ( <i>Polar Continuous Phase</i> )
PG	Galato de propila ( <i>Propyl Gallate</i> )
PTFE	Politetrafluoroetileno
SDS	Dodecil sulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
TBHQ	<i>tert</i> -butil-hidroquinona ( <i>tert-Butylhydroquinone</i> )
TBS	Tetraborato de sódio
TEA	Trietilamina
ume	Ultramicroeletrodo

## RESUMO

Métodos voltamétricos e por cromatografia capilar eletrocinética em microemulsão (MEEKC) com detecção UV foram empregados neste estudo para desenvolver metodologia de análise direta dos antioxidantes BHA, TBHQ, BHT e PG em biodiesel, sem extração ou pré-concentração, empregando a técnica de adição de padrão. Água, SDS e *n*-pentanol constituem a microemulsão do tipo água em óleo (ME a/o) na qual foi dissolvida a amostra de biodiesel. Nesse meio, a partição dos analitos ocorre entre a fase contínua da ME e as gotículas de água. Tanto medidas por voltametria potenciodinâmica como de pulso diferencial indicaram uma relação linear entre o teor de TBHQ no meio e a corrente de oxidação, obtendo-se, a partir das curvas analíticas, concentrações em biodiesel de mesma ordem de grandeza, o que evidencia a viabilidade dessa determinação. Nos ensaios por MEEKC, não foi possível separar os antioxidantes BHA, TBHQ e BHT, provavelmente por terem mobilidades semelhantes às dos ésteres do biodiesel, nas condições dos experimentos. A adição de trietilamina (TEA) à ME a/o, visando obter o ânion correspondente ao PG, permitiu sua separação e identificação com um tempo de retenção de 17 minutos e tempo de migração relativo 0,23. A reação entre o PG e a TEA foi confirmada por espectrometria de absorção no UV-Vis. Ainda, as baixas condutividades das MEs a/o contendo biodiesel evitaram o efeito *antistacking*, favorecendo seu uso na análise direta de antioxidantes por voltametria e MEEKC.



## ABSTRACT

Voltammetry and microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) with UV detection were employed in this study aiming the direct analysis of the antioxidants BHA, TBHQ, BHT and PG in biodiesel, without pre-concentration or extraction, using the standard addition method. The biodiesel sample was dissolved in a water-in-oil microemulsion (w/o ME) containing water, *n*-pentanol and SDS. In this medium, the partitioning of the analytes takes place between the w/o ME continuous phase and the dispersed water droplets. Determination of the TBHQ content in biodiesel, either through potentiodynamic voltammetry or differential pulse voltammetry indicated a linear relationship between the oxidation current and the concentration of the antioxidant. The results obtained from the analytical curves showed concentrations of the analyte in biodiesel of the same order of magnitude, evidencing the viability of the procedure. Separation of the antioxidants BHA, BHT and TBHQ were not feasible through MEEKC, probably because their mobilities are similar to those of the biodiesel esters under the experimental conditions employed. Addition of triethylamine (TEA) to the w/o ME, in order to obtain the PG corresponding anion, allowed its separation and identification with a retention time of 17 minutes and a relative migration time of 0.23. The reaction between PG and TEA in the w/o ME was confirmed by UV-Vis absorption spectroscopy. Still, the low conductivities of the w/o MEs containing biodiesel avoided antistacking effect, thus favoring the direct analysis of antioxidants by voltammetry and MEEKC.

# 1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes de energia renovável, um desafio a fim de suprir a demanda energética mundial, é de grande importância devido à diminuição das reservas de petróleo e ao crescente aumento da poluição ambiental; dentre as alternativas atualmente mais pesquisadas encontra-se o biodiesel, fonte energética sustentável, tanto sob o aspecto ambiental como econômico e social<sup>1-4</sup>.

O biodiesel é um combustível biodegradável, produzido a partir de fontes renováveis, como gorduras animais ou óleos vegetais<sup>4,5</sup>; tecnicamente, o biodiesel é um alquil éster de ácidos graxos, obtido pelo processo de transesterificação de óleos ou gorduras<sup>6</sup>. Um aspecto que restringe o uso do biodiesel é sua baixa estabilidade frente à oxidação, a qual é intensificada com o aumento do número de insaturações na cadeia carbônica<sup>1,3</sup>. Entretanto, é possível aumentar essa estabilidade com a adição de antioxidantes fenólicos sintéticos, comumente usados em alimentos<sup>7,8</sup>.

Diversos métodos são empregados para identificar e quantificar antioxidantes, dentre os quais métodos cromatográficos<sup>8</sup> e voltamétricos<sup>9,10</sup>. Dentre aqueles estão as cromatografias 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 as duas primeiras as técnicas mais utilizadas<sup>8</sup>. No entanto, a eletroforese capilar apresenta diversas vantagens sobre as demais, tais como menor tempo de análise, boa resolução, possibilidade de injeção e detecção em fluxo e pequenos volumes de amostra (da ordem de 1 a 10 nL)<sup>11</sup>. Quanto aos detectores, entre os mais utilizados em métodos cromatográficos estão a detecção UV<sup>12-16</sup>, condutométrica<sup>17-21</sup>, por espectrometria de massa<sup>22-25</sup> e, ainda, fluorimétrica<sup>26</sup>.

Para que o biodiesel seja efetivamente empregado como biocombustível, faz-se necessário conhecer suas características e estabelecer padrões de qualidade, a fim de preservar o motor e garantir a segurança do consumidor.

As amostras para análise do biodiesel, seja para a determinação de glicerol<sup>2</sup>, cátions inorgânicos<sup>4</sup> ou antioxidantes<sup>12</sup>, são, em geral, preparadas por extração do analito de interesse com solventes orgânicos ou com pré-concentração de analitos minoritários; esses processos aumentam o tempo de análise e o consumo de solventes e podem levar, por exemplo, à contaminação da amostra. Por esse motivo, é importante o desenvolvimento de metodologias

que permitam analisar o biodiesel de forma direta, como, por exemplo, empregando microemulsões de biodiesel em água ou de água em biodiesel na preparação das amostras.

Microemulsões são sistemas micro-heterogêneos formados por óleo, água, um surfactante e, algumas vezes, um co-surfactante (um álcool de cadeia média). Além de serem extremamente estáveis termodinamicamente, as microemulsões apresentam condutividade elétrica maior do que a maioria dos solventes orgânicos, bem como alta capacidade de solubilização tanto de substâncias hidrofílicas como hidrofóbicas<sup>27-29</sup>.

As microemulsões, sejam elas do tipo água em óleo ou óleo em água, têm sido largamente estudadas nos últimos anos, pois além de diminuir gastos e consumo de solventes orgânicos, elas possibilitam medidas eletroquímicas, já que aumentam a condutividade do meio<sup>28,29</sup> e diminuem a viscosidade, o que causa um decréscimo na resistência da solução ao deslocamento de espécies presentes. Desse modo, o uso da voltametria empregando ultramicroeletrodos se torna adequado, pois esses apresentam características como baixa queda ôhmica e rápido estabelecimento do estado estacionário, em razão de suas dimensões geométricas, da ordem de micrômetros<sup>28</sup>.

No presente estudo, empregaram-se a voltametria e a eletroforese capilar com detecção UV como técnicas de caracterização e quantificação de antioxidantes em amostras de biodiesel, preparadas na forma de microemulsões.

## **1.1. OBJETIVOS**

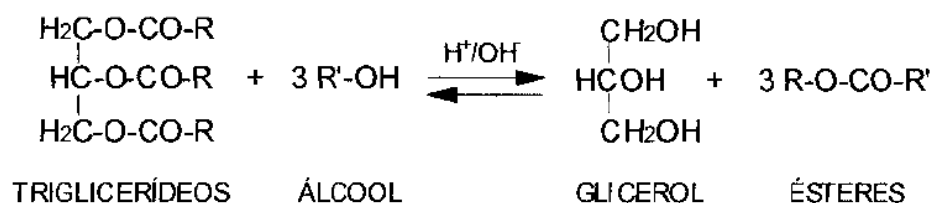
Este estudo teve por objetivos:

1. Verificar a viabilidade do uso de microemulsões de água em óleo como meio solvente para biodiesel;
2. Aplicar as técnicas de eletroforese capilar e voltametria para análise de antioxidantes em biodiesel;
3. Desenvolver metodologia para análise direta de antioxidantes fenólicos sintéticos em amostras de biodiesel, preparadas na forma de microemulsões de água em óleo, por eletroforese capilar, sem extração ou pré-concentração.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O BIODIESEL

Quimicamente, o biodiesel é um alquil éster de ácidos graxos, obtido pelo processo de transesterificação (Figura 1) de óleos ou gorduras<sup>6,30</sup>, com a utilização de alcoóis (metanol ou etanol) e catalisadores (ácidos ou básicos)<sup>30</sup>. No Brasil, algumas oleaginosas que podem ser usadas para produzir o biodiesel são a mamona, a soja o dendê, o girassol, o babaçu, dentre outras<sup>31</sup>.



**Figura 1.** Reação de transesterificação de triglicerídeos, onde: R = cadeia carbônica dos ácidos graxos; R' = cadeia carbônica do álcool reagente<sup>32</sup>.

A Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, define o biodiesel como um “*biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores à combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil*”<sup>31</sup>.

Essa lei introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira e, a partir dela, a responsabilidade de regular e fiscalizar as atividades relativas à produção, controle de qualidade, distribuição, revenda e comercialização do biodiesel e da mistura óleo diesel-biodiesel (BX, e.g. B20 diz respeito a uma blenda com 20% de biodiesel) é da ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis).

Conforme a Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicada no Diário Oficial da União em 26 de outubro de 2009, um teor de 5% de biodiesel (quando adicionado) deve estar presente no óleo diesel comercializado no Brasil, que está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, cuja produção anual, em 2010, foi de 2,4 bilhões de litros e, em 2011, cerca de 2,5 bilhões de litros<sup>31</sup>.

Sabidamente, a produção e o uso do biodiesel no Brasil possibilitam o desenvolvimento de uma fonte energética sustentável, tanto sob aspectos ambientais como

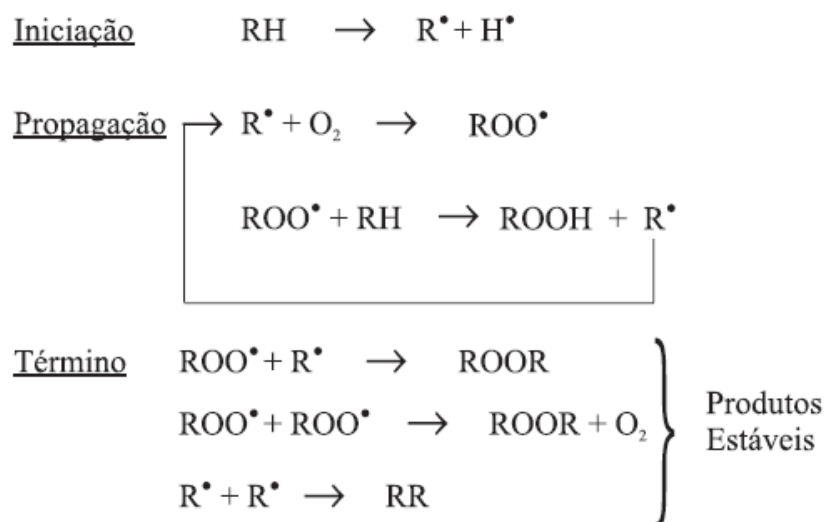
econômicos e sociais, além de também trazerem a perspectiva da redução das importações de óleo diesel, o que gera divisas para o país<sup>3,31</sup>. Outros benefícios vindos do biodiesel incluem o incremento a economias locais e regionais, tanto na etapa agrícola como na indústria de bens e serviços, pois com a ampliação do mercado do biodiesel, milhares de famílias brasileiras são beneficiadas, principalmente agricultores da região semiárida brasileira, com o aumento de renda proveniente do cultivo e comercialização das plantas oleaginosas utilizadas na produção do biodiesel. Além disso, um dos efeitos sobre o meio ambiente é a diminuição das principais emissões veiculares, em comparação ao diesel derivado do petróleo<sup>31</sup>.

O biodiesel apresenta ainda outras vantagens sobre o óleo diesel, tais como: biodegradabilidade, maiores viscosidade e ponto de fulgor, o que aumenta a lubricidade e a segurança no manuseio e armazenamento, respectivamente<sup>33</sup>; pode ainda ser utilizado em motores convencionais, os quais necessitam de apenas algumas adaptações<sup>1,2,4,33</sup>, sozinho ou em blendas com o diesel<sup>33</sup>.

Apesar das vantagens acima citadas, o biodiesel também possui algumas desvantagens em relação ao diesel: em baixas temperaturas, o biodiesel tende a solidificar parcialmente, levando à interrupção do fluxo do biocombustível e entupimento do sistema de filtração<sup>3</sup>; é solvente de compostos elastoméricos, como borrachas, o que exige que tais componentes sejam substituídos ou adequadamente protegidos<sup>33</sup>; possui uma estabilidade baixa frente à oxidação<sup>34</sup>, a qual é favorecida por fatores como o contato com o ar e o aumento de insaturações na cadeia carbônica<sup>3,7,33</sup>, as quais são oriundas do próprio material do qual o biodiesel é produzido<sup>35</sup>. Os processos oxidativos assim favorecidos causam um aumento indesejável na viscosidade do biocombustível e, em estágios mais avançados, levam à formação de produtos insolúveis que obstruem filtros e sistemas de injeção. Além disso, o aumento da acidez e da presença de hidroperóxidos promovem a corrosão dos componentes do motor<sup>35</sup>.

A baixa estabilidade oxidativa do biodiesel, durante o armazenamento, foi investigada por Du Plessis<sup>36</sup> e colaboradores que publicaram, em 1985, um estudo sobre a estabilidade oxidativa de ésteres metílicos e etílicos de óleo de semente de girassol. Os problemas encontrados em relação à estocagem do biodiesel foram atribuídos à degradação hidrolítica e oxidativa. A degradação hidrolítica (a qual gera produtos de oxidação primários) consiste na hidrólise dos ésteres metílicos, podendo ser influenciada pelo teor de ácidos no biodiesel. Nesse caso, a água atua como catalisador da reação e, dependendo da temperatura, pode emulsificar ou separar as fases com precipitação. A degradação oxidativa (a qual gera produtos de oxidação secundários) é influenciada pela natureza da substância gordurosa

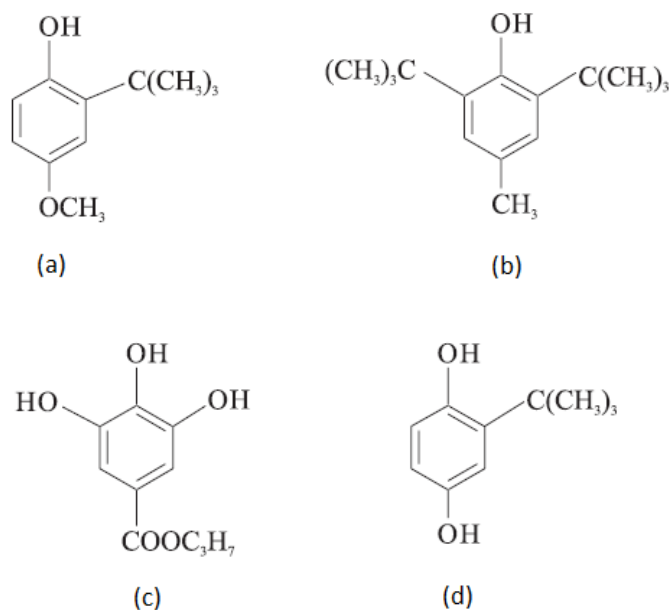
original (em termos do número de duplas ligações) e pela presença de agentes pró-oxidantes tais como a luz ultravioleta, o ar, umidade, metais e temperatura<sup>37,35</sup>. Os processos oxidativos do biodiesel podem ocorrer por meio enzimático, fotooxidativo ou por autooxidação (principal mecanismo de oxidação de óleos e gorduras), representado na Figura 2, a seguir.



**Figura 2.** Esquema geral do mecanismo de oxidação lipídica, onde: RH = ácido graxo insaturado; R<sup>•</sup> = radical livre; ROO<sup>•</sup> = radical peróxido; ROOH = hidroperóxido<sup>38</sup>.

Sabe-se que os antioxidantes naturais (tocoferóis), já presentes no material de origem do biodiesel, são transferidos parcialmente para os ésteres produzidos, em concentrações que dependem da tecnologia usada na síntese do biocombustível. Desse modo, dependendo do quanto esses antioxidantes naturais foram removidos ou ainda do grau de insaturação dos ésteres gerados, a adição de antioxidantes sintéticos, ou a reintrodução dos naturais, ao biodiesel, é fundamental para seu uso futuro<sup>35</sup>.

Os antioxidantes fenólicos sintéticos (também utilizados em alimentos), como butil-hidroxi-anisol (BHA, do inglês *Butylated Hydroxyanisole*), butil-hidroxi-tolueno (BHT, do inglês *Butylated Hydroxytoluene*), *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ, do inglês *tert-Butylhydroquinone*) e galato de propila (PG, do inglês *Propyl Gallate*)<sup>1,7,34</sup>, cujas estruturas fenólicas são mostradas na Figura 3, permitem a doação de um próton a um radical livre, interrompendo o processo de oxidação do biocombustível.



**Figura 3.** Estruturas fenólicas dos antioxidantes sintéticos: (a) BHA; (b) BHT; (c) PG; (d) TBHQ<sup>38</sup>.

A literatura reporta diversos métodos analíticos para detectar e quantificar essas substâncias (em sua maioria em alimentos): análise por injeção em batelada com detecção amperométrica<sup>7</sup>; voltametria com eletrodos convencionais<sup>39</sup> e ultramicroeletrodos<sup>9,10</sup>; HPLC<sup>8,40</sup>; GC<sup>41,42</sup> e, também, eletroforese capilar (CE)<sup>12</sup>, sendo mais amplamente empregadas as técnicas HPLC e GC<sup>8</sup>. A eletroforese capilar se apresenta como uma técnica complementar às duas anteriores, ou até alternativa<sup>43</sup>.

Os métodos eletroquímicos empregados para análise de biodiesel também são vantajosos por fornecerem informações valiosas a respeito do meio em estudo e apresentar vantagens como alta sensibilidade<sup>44</sup>; porém, em razão da elevada viscosidade e baixa condutividade elétrica do biodiesel, medidas eletroquímicas diretas necessitam de um meio solvente que as viabilize.

Não obstante, independentemente da técnica a ser empregada, o meio deve apresentar características adequadas. Nesse ponto, microemulsões têm recebido forte atenção por parte de laboratórios industriais e acadêmicos.

## 2.2. MICROEMULSÕES

Tendo em vista as características físico-químicas do biodiesel, as microemulsões se apresentam como um meio solvente alternativo de análise.

As microemulsões foram introduzidas em 1943 por Hoar e Schulman<sup>44-46</sup>, e, desde então, encontram as mais variadas aplicações, como meio de polimerização<sup>47</sup> e para preparação de polímeros condutores<sup>48</sup>; síntese de nanopartículas<sup>49-51</sup>/nanocristais<sup>52</sup>; carreadores de fármacos<sup>45,53</sup>; e também como meio de análise, e.g. hormônios em plantas<sup>54</sup> e antioxidantes alimentícios<sup>43</sup>.

Microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, opticamente transparentes, isotrópicos e micro-heterogêneos formados por partículas/canais nanométricos (na ordem de 5 a 100 nm) suspensas em uma fase contínua<sup>28,29,46</sup>. São formadas por óleo, água, um surfactante e, algumas vezes, por um co-surfactante (normalmente um álcool de cadeia curta ou média<sup>44,46</sup>).

### 2.2.1. Teoria de Formação das Microemulsões

Uma das teorias a respeito da formação de microemulsões é a chamada “teoria termodinâmica das microemulsões”<sup>45,55</sup>. Sabe-se que, quando se misturam dois líquidos imiscíveis, sob agitação constante, há a formação de gotículas dispersas de ambos os líquidos, um no outro; no entanto, a partir do momento em que a agitação é interrompida, os líquidos se separam, causando a desestabilização da emulsão formada<sup>55</sup>.

A dispersão de um dos líquidos no outro acarreta um aumento da área interfacial, e, conseqüentemente, da variação da energia livre de Gibbs, a qual deve ser negativa para que ocorra a formação espontânea da microemulsão<sup>45,55</sup>. A variação da energia livre associada à dispersão das gotículas, em condições de pressão e temperatura constantes, pode ser descrita pela Equação 1 a seguir:

$$\Delta G = \gamma_i \Delta A - T\Delta S \quad [1]$$

onde  $\gamma_i$  é a tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa,  $\Delta A$  é a variação da área interfacial,  $T$  é a temperatura e  $\Delta S$  é a variação da entropia.

Para que uma emulsão possa ser estabilizada, deve-se diminuir a tensão interfacial da dispersão, a fim de diminuir a energia livre de Gibbs, uma vez que aquela não pode ser nula. O segundo termo da Equação [1] diz respeito ao aumento da entropia, o qual é resultante do aumento do número de gotículas dispersas. Pode-se verificar, pela Equação [1], que a estabilidade da emulsão é maior quanto menor for a energia livre, tendendo a um sistema termodinamicamente estável.



Em uma mistura de dois líquidos, estando um disperso no outro, surge espontaneamente uma pressão no interior das gotículas, denominada “pressão de Laplace”, que varia inversamente com o raio da gotícula, sendo essa relação mostrada pela Equação [2]<sup>56</sup>:

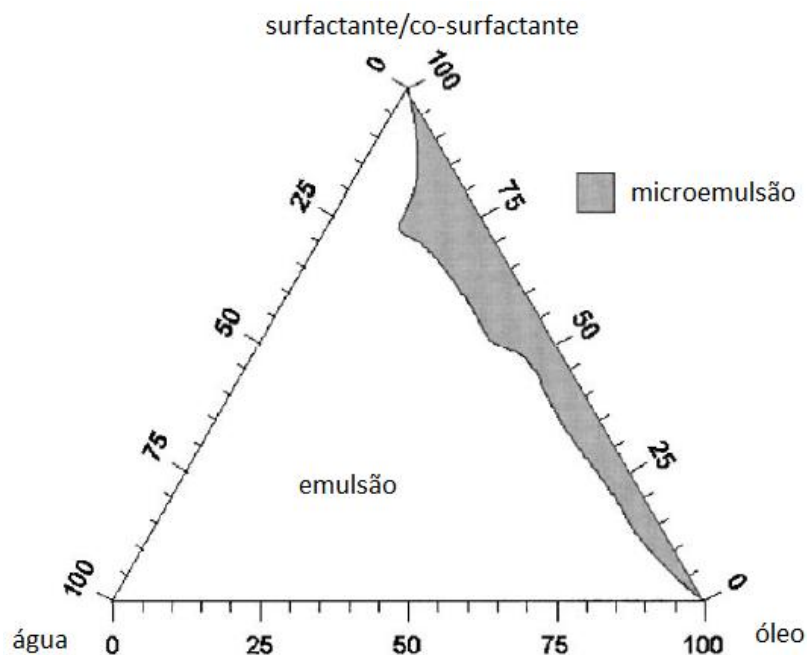
$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad [2]$$

onde  $\gamma$  é a tensão interfacial,  $\Delta P$  é a variação da pressão no interior da gotícula e  $r$  é o raio da gotícula. Como se pode observar, uma alta tensão interfacial implica em uma maior pressão no interior da gotícula; também, como a relação entre a pressão interna e o raio é inversamente proporcional, um menor raio resulta em uma maior pressão. Aplicando essa relação para uma emulsão onde duas gotículas com a mesma tensão interfacial estão próximas, a gotícula de menor raio, por ter uma pressão interna maior, tende a coalescer com a gotícula de raio maior<sup>56</sup>.

Os surfactantes diminuem a tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa, sendo, portanto, fundamentais para estabilizar as gotículas nas microemulsões. Devido à repulsão de cargas dos grupos polares do surfactante, não é possível obter um empacotamento eficiente das gotículas, uma vez que ainda se tem alguma tensão interfacial; com a adição do co-surfactante, a tensão interfacial praticamente se anula, aumentando a estabilidade do sistema e colaborando também na solubilização das fases aquosa e oleosa<sup>44,46,55</sup>.

### 2.2.2. Diagrama de Fases

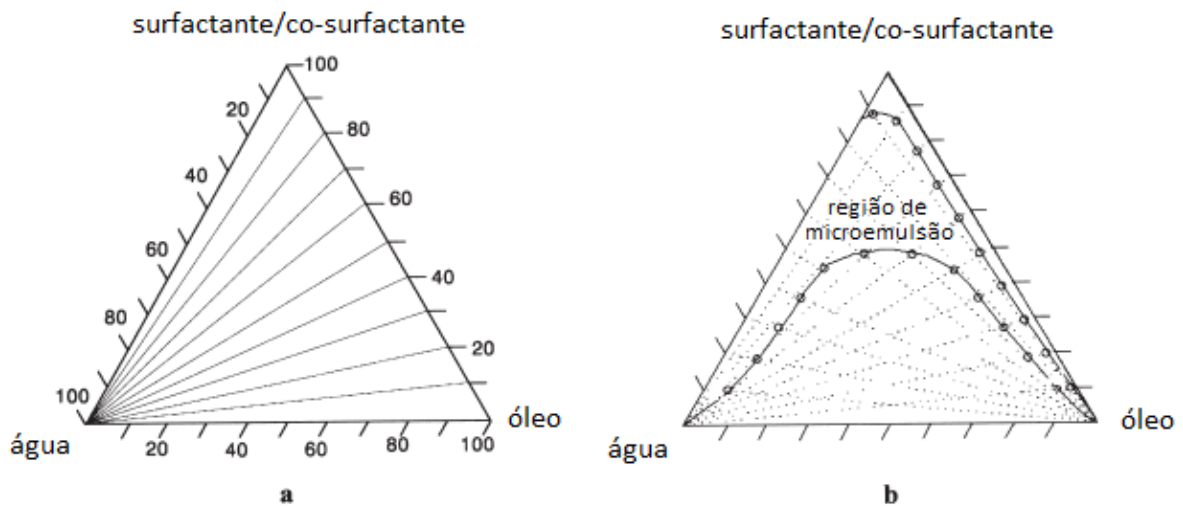
A mistura dos componentes da microemulsão, dentro da região de um diagrama de fases (Figura 4), é capaz de formar diferentes estruturas internas<sup>45</sup>, influenciadas pelas proporções dos componentes, bem como por suas propriedades físico-químicas.



**Figura 4.** Diagrama de fases pseudo-ternário para uma microemulsão composta por água, óleo, surfactante e co-surfactante<sup>57</sup>.

O diagrama de fases descreve as condições experimentais nas quais é possível obter microemulsões, bem como as regiões limites de transição. O modo mais comum de representar uma microemulsão de quatro componentes é por meio de um diagrama de fases pseudo-ternário, onde as fases puras aquosa e oleosa, bem como a mistura surfactante/co-surfactante, são colocadas nos vértices do triângulo.

Para se obter um diagrama de fases, inicialmente misturam-se água e óleo com um surfactante, titulando a emulsão resultante com um co-surfactante até ocorrer a formação de um sistema opticamente transparente, determinando-se a relação surfactante/co-surfactante adequada para a obtenção da microemulsão. Em seguida, titula-se, com água, uma mistura de óleo e surfactante/co-surfactante, traçando linhas convergentes ao vértice do diagrama correspondente à fase aquosa. O mesmo é feito para uma titulação com óleo da mistura de água com surfactante/co-surfactante (Figura 5a). Os pontos do diagrama de fases na Figura 5b dizem respeito a modificações no sistema microemulsionado, e.g. separação de fases, transparência, opacidade, etc.

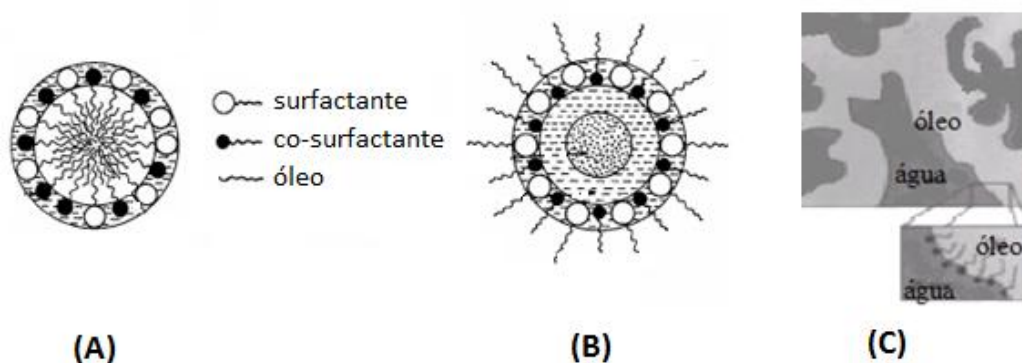


**Figura 5.** (a) Titulação com fase aquosa; (b) Representação dos pontos de transparência da titulação e região do diagrama correspondente à região de microemulsão (adaptado)<sup>55</sup>.

### 2.2.3. Tipos de Microemulsões

Quando moléculas lipossolúveis estão localizadas no interior das gotículas de óleo, e essas, por sua vez, estão dispersas em uma fase contínua aquosa, a microemulsão é conhecida como do tipo óleo em água (ME o/a). Se o inverso ocorre, ou seja, moléculas hidrossolúveis se encontram no interior de gotículas de água, as quais estão dispersas em uma fase contínua oleosa, tem-se uma microemulsão de água em óleo (ME a/o). Esses são os principais tipos de microemulsão<sup>46</sup>. Um terceiro tipo de microemulsão pode se formar, quando tanto o óleo como a água são fases contínuas, originando uma rede na qual ambos são canais intercalados por monocamadas de filme interfacial de surfactante/co-surfactante; esse tipo de microemulsão é conhecido como bicontínuo<sup>44,45</sup>.

A Figura 6 mostra uma representação dos três tipos de microemulsão.



**Figura 6.** Representação esquemática: (A) ME o/a; (B) ME a/o (adaptado)<sup>58</sup>; (C) Microemulsão bicontínua (adaptado)<sup>44</sup>.

#### 2.2.4. Técnicas de Caracterização de Microemulsões

A elucidação da estrutura interna das microemulsões é complexa e requer técnicas sofisticadas de análise. Alguns métodos com esse propósito incluem 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*)<sup>44,58</sup>. 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<sup>44</sup>.

Ainda, outros métodos, e.g. medidas de condutividade, viscosidade, tensão interfacial e turbidez, são utilizados para que se tenha uma melhor compreensão das propriedades condutoras, bem como reações químicas e processos de transferência de massa que ocorrem nas microemulsões<sup>44</sup>.

### 2.3. ELETROFORESE CAPILAR

Nas últimas décadas, grandes avanços tecnológicos foram feitos no que diz respeito à ciência das separações, em termos de instrumentação analítica: implementaram-se as técnicas GC e HPLC e, no final da década de 80, a eletroforese capilar (CE)<sup>11</sup>.

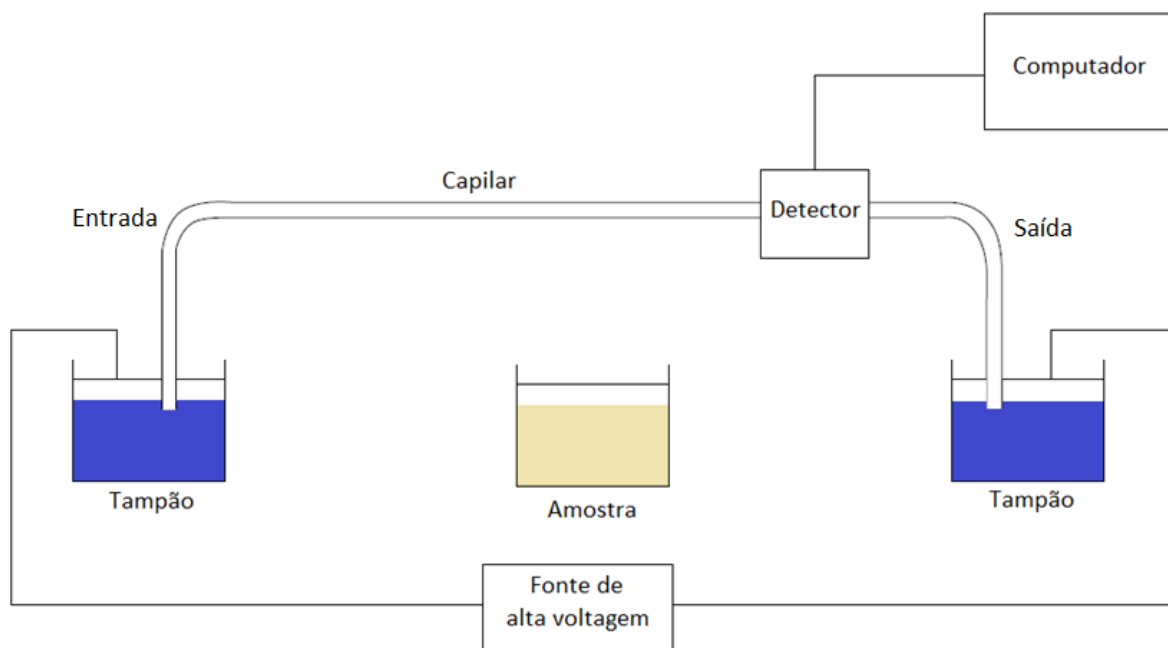
Historicamente, a eletroforese foi introduzida na década de 1930 por Tiselius, sendo que a primeira demonstração do uso de campos elétricos elevados na técnica foi feita por Hjérten, na década de 1960. Jorgenson e colaboradores contribuíram significativamente, no início da década de 1980, para o crescimento inicial da CE como técnica analítica instrumental, a qual apresentou um rápido avanço devido a fatores como simplicidade instrumental, diversidade de compostos que podem ser analisados (desde pequenos íons, como o lítio, até macromoléculas, como proteínas) e variedade dos modos de separação que podem ser realizados<sup>59,60</sup> em uma única coluna capilar<sup>11</sup>.

A separação, na CE, se dá em capilares de sílica fundida revestidos com um filme polimérico, cujo diâmetro interno varia entre 15 e 100  $\mu\text{m}$ , que são preenchidos com um eletrólito denominado eletrólito de corrida. O uso desses capilares oferece diversas vantagens

sobre outros meios usuais na eletroforese (e.g. placas de gel), dentre elas uma eficiente dissipação do calor gerado pela passagem de corrente elétrica (efeito Joule). Ainda, é possível a aplicação de campos elétricos ( $100$  a  $500 \text{ V cm}^{-1}$ ) e voltagens elevadas ( $30$  a  $50 \text{ kV}$ )<sup>44</sup>, resultando em separações mais eficientes. Além disso, ao contrário de outros métodos cromatográficos, o volume de amostra necessário para análise é extremamente baixo, entre  $1$  a  $10 \text{ nL}$ , havendo também a possibilidade de injeção e detecção em fluxo<sup>11</sup>. Sua principal desvantagem é a baixa repetibilidade no processo de injeção, fazendo-se necessário o uso de padrões internos na análise quantitativa<sup>44</sup>.

### 2.3.1. Equipamento para Eletroforese Capilar

Em um aparelho para CE, o capilar é preenchido com o eletrólito de corrida contido em dois recipientes (*vials*), nos quais ambas as extremidades do capilar são mergulhadas, e a amostra é injetada na extremidade de entrada do capilar (comumente de modo hidrodinâmico) na forma de um *plug*. Por meio da aplicação de uma diferença de potencial, é gerado um fluxo no interior do capilar, que transporta a amostra até um detector, em geral de absorção no UV-Visível, gerando o registro gráfico de determinados componentes da amostra, chamado eletroferograma. A Figura 7 mostra uma representação esquemática de um aparelho de CE.

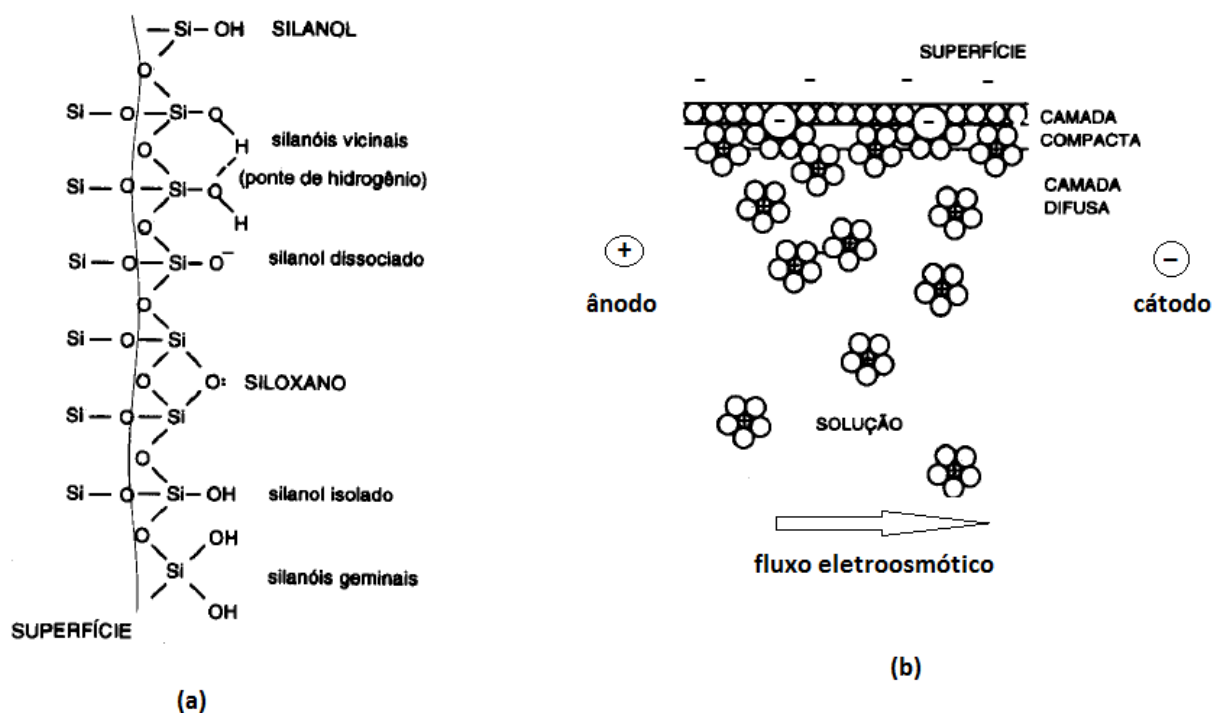


**Figura 7.** Esquema de um equipamento de eletroforese capilar (adaptado)<sup>44</sup>.

O sentido em que os analitos se deslocam no capilar (do ânodo para o cátodo ou o inverso) depende da voltagem aplicada (se positiva ou negativa, em relação à extremidade do capilar na qual se encontra o detector) e influencia a magnitude do fluxo eletrosmótico.

### 2.3.2. Fluxo Eletrosmótico

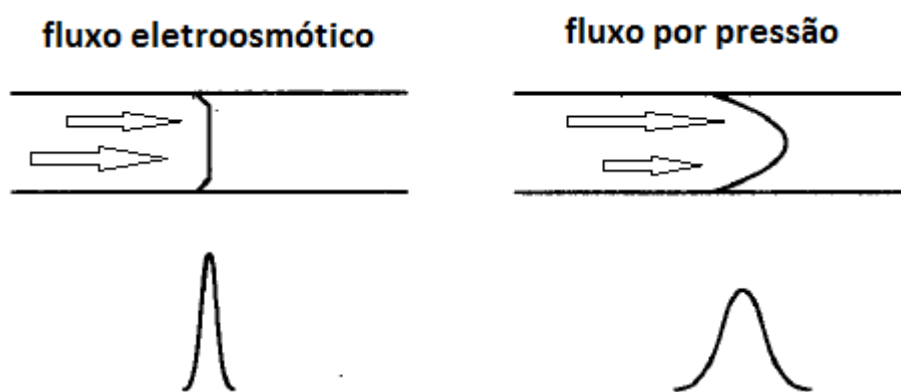
Dentro do capilar, além da migração eletroforética dos analitos, ocorre outro fenômeno de migração que confere à técnica parte de sua alta eficiência, a eletrosmose, ou seja, o fluxo de solução induzido pelo campo elétrico aplicado<sup>11</sup>. O material do qual o capilar é feito (sílica fundida) caracteriza-se pela presença de grupos silanois, de fraco caráter ácido, mas que, em contato com o eletrólito de corrida, podem se ionizar, dando origem a uma dupla camada elétrica na parede do capilar. Quando uma diferença de potencial é aplicada, essa dupla camada permanece imóvel, enquanto os íons solvatados no centro do capilar deslocam-se ao longo do mesmo, dando origem ao fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*) (Figura 8)<sup>44</sup>.



**Figura 8.** Representação esquemática: (a) Estrutura química da superfície de um capilar de sílica; (b) Modelo para interface capilar/solução aquosa e fluxo eletrosmótico (adaptado)<sup>61</sup>.

A intensidade do EOF é governada pelo pH do eletrólito de corrida. Em valores de pH baixos a ionização dos grupos silanois é pequena e, portanto, o EOF é baixo; em contrapartida, em altos valores de pH a ionização dos grupos silanois é maior, resultando em um elevado EOF<sup>44,61</sup>.

O EOF contribui sobremaneira para a alta eficiência de separação da CE, sendo caracterizado por um perfil radial constante da velocidade, o que evita o alargamento das bandas. Tal peculiaridade distingue a CE de outros métodos cromatográficos em fase líquida, os quais mostram variação parabólica para o perfil radial da velocidade, típica do fluxo induzido por pressão (Figura 9). Ainda, o EOF é responsável, sem distinção de carga, por transportar solutos na direção do detector, possibilitando a análise de amostras contendo cátions, ânions ou solutos neutros<sup>11</sup>.



**Figura 9.** Perfil do fluxo eletroosmótico (induzido por campo elétrico) comparado com o fluxo gerado por pressão, e seus respectivos efeitos nas bandas (adaptado)<sup>61</sup>.

Visto que o EOF influencia no resultado das separações, faz-se necessário ter controle sobre o mesmo. Segundo Tavares<sup>61</sup>, o EOF pode ser modificado tanto pela alteração das propriedades físico-químicas da solução, e.g. pH, concentração, força iônica, como pela modificação química da superfície do capilar.

### 2.3.3. Efeito *Stacking*

O empilhamento (do inglês, *stacking*) é uma técnica de concentração de amostra *online* usualmente empregada na CE<sup>46</sup>, por dois motivos: o aumento do número de pratos teóricos causado pelo volume da injeção e o enriquecimento da amostra<sup>62</sup>, aumentando a sensibilidade da detecção.

As diferenças entre as condutividades da amostra injetada e do eletrólito de corrida alteram a força do campo elétrico (e também a resistência) distribuído em cada zona do capilar, em consequência da lei de Ohm ( $E = IR$ ), que assume a forma:

$$E = IR_1 + IR_2 \quad [3]$$

onde  $R_1$  e  $R_2$  representam, respectivamente, as resistências das zonas da amostra e do eletrólito de corrida e  $E$  é a força do campo elétrico, o qual é proporcional à velocidade de migração ao longo do capilar. Quando amostras de condutividade menor que a do eletrólito de corrida são injetadas, o *stacking* ocorre, permitindo a injeção de volumes maiores de amostra sem causar alargamento de banda devido à ocorrência de compressão de zona. Em contrapartida, se amostras de condutividade maior que a do eletrólito de corrida são injetadas, ocorrerá alargamento de banda, ou o efeito *antistacking*<sup>62</sup>.

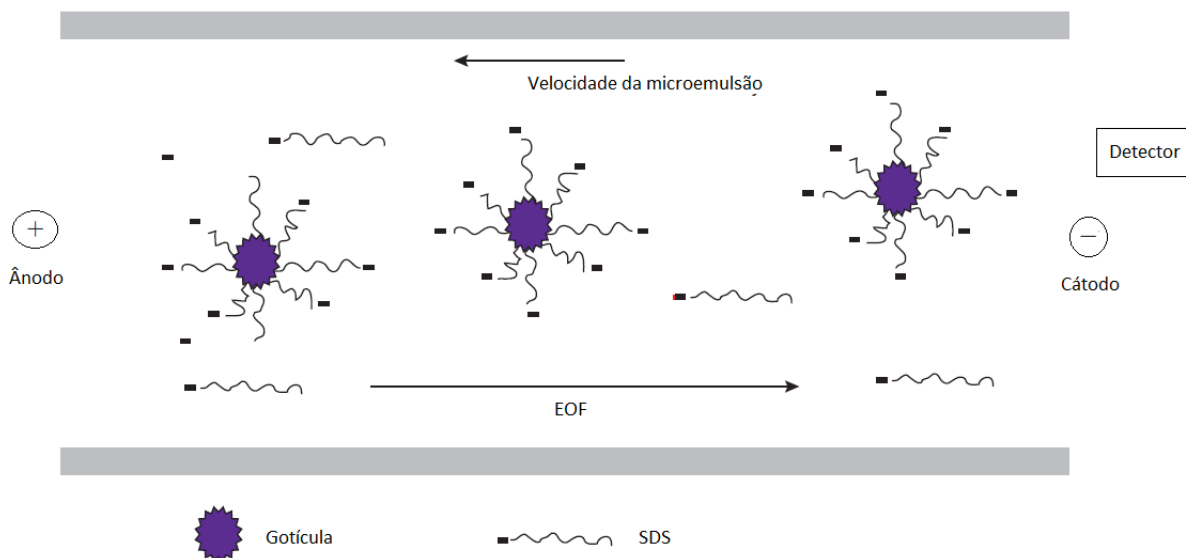
Uma vez que a velocidade eletroforética de um soluto é proporcional à força do campo elétrico, velocidades diferentes podem ser obtidas em cada zona dentro do capilar, sendo desejável que o *stacking* ocorra na zona de injeção. Tal efeito é alcançado com amostras de baixa condutividade<sup>62</sup>.

#### 2.3.4. Cromatografia Capilar Eletrocínética em Microemulsão

A técnica que utiliza microemulsões como meio de separação em CE foi desenvolvida em 1991 por Watarai, e possibilita uma eficiente separação de solutos neutros e carregados, com base em suas hidrofobicidade e mobilidade eletroforética<sup>44,63</sup>.

Na cromatografia capilar eletrocínética em microemulsão (MEEKC, do inglês *Microemulsion Electrokinetic Chromatography*), as gotículas dispersas atuam como uma fase pseudo-estacionária, permitindo a separação tanto de solutos carregados como neutros. Os solutos sofrem partição entre as fases que constituem as microemulsões (gotículas e fase contínua), que migram com diferentes velocidades. Por exemplo, em uma ME o/a, quanto mais hidrofóbico o soluto, mais ele irá sofrer partição para dentro da gotícula da microemulsão, levando mais tempo para migrar; já os solutos hidrofílicos permanecerão na fase contínua da microemulsão e migrarão mais rapidamente em direção ao detector<sup>46</sup>. A Figura 10 apresenta o esquema do princípio de separação da MEEKC em uma ME o/a.





**Figura 10.** Representação esquemática do princípio de separação por MEEKC em ME o/a (adaptado)<sup>64</sup>.

As microemulsões, ao contrário das micelas, não possuem uma estrutura tão rígida, o que facilita a penetração dos solutos. Tal característica permite que a MEEKC encontre uma gama de aplicações maior do que a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography*)<sup>63</sup>, e.g. determinação de vitaminas<sup>65</sup>, bioanálises<sup>66</sup>, análise de produtos naturais<sup>67</sup> e antibióticos<sup>66</sup>.

## 2.4. TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS DE ANÁLISE

Como já mencionado anteriormente, as microemulsões possuem uma alta condutividade elétrica quando comparadas ao biodiesel puro, o que possibilita a realização de medidas eletroquímicas, dentre elas a voltametria.

### 2.4.1. Técnicas Voltamétricas

As técnicas eletroanalíticas de análise encontram vasta aplicação em campos tão distintos como química ambiental<sup>69</sup>, bioquímica<sup>70</sup>, biologia molecular<sup>71</sup> e físico-química<sup>72</sup> visando o estudo de propriedades de certas substâncias. Tais estudos são feitos a partir de medidas como corrente, potencial, carga, condutividade, e outras, as quais se relacionam com a concentração do analito<sup>73</sup>.

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 extração ou purificação, 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>73</sup>.

Tantas vantagens levaram a um rápido desenvolvimento de técnicas cada vez mais sensíveis e sofisticadas, com a utilização de eletrodos cada vez menores, principalmente devido à enorme aplicação encontrada para estudos biológicos<sup>74-76</sup>. Os ultramicroeletrodos, ou seja, eletrodos com dimensões micrométricas<sup>77</sup> (pelo menos uma dimensão menor que 25 µm) são empregados tanto em bioquímica<sup>78,79</sup> como em diversas outras áreas<sup>9,10,80</sup>.

Sabe-se que a condutividade de uma ME o/a é maior se comparada com a condutividade de uma ME a/o, a qual, por sua vez, é maior do que à de solventes apolares ou do próprio biodiesel, o que viabiliza a utilização das técnicas voltamétricas nesses sistemas. No entanto, a literatura ainda é escassa no que diz respeito a estudos empregando ME a/o. Considerando que, não somente os antioxidantes, mas as espécies a serem estudadas no biodiesel se encontram na fase oleosa, é desejável que a quantidade de biodiesel seja a maior possível para que se façam determinações analíticas quantitativas.

#### **2.4.2. Ultramicroeletrodos**

Os primeiros trabalhos utilizando ultramicroeletrodos (ume) foram feitos no final da década de 1960 por Fleischmann e colaboradores, sendo mais amplamente empregados em estudos eletroanalíticos e bioeletroquímicos no início da década de 1980<sup>81</sup>.

Os ume, por possuírem dimensões menores que os eletrodos convencionais, apresentam algumas peculiaridades. Reduzir a área de um eletrodo acarreta em consequências como:

- i. As velocidades 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 diminui;
- iii. Devido à diminuição da corrente, a queda ôhmica é reduzida.

Uma grande vantagem dos ume é a possibilidade de realizar experimentos em meios altamente resistivos. Além disso, é possível conduzir experimentos em soluções congeladas e, ainda, em fase gasosa<sup>81</sup>. Os ume exibem altas densidades de corrente, mas as correntes totais são baixas em razão da área micrométrica, permitindo que o estado estacionário seja

alcançado em condições que, com eletrodos convencionais, não seria possível, e.g. na ausência de um eletrólito suporte<sup>82</sup>.

Como já mencionado, a velocidade de transporte de massa (por difusão e convecção) para um ume é diferente da de um eletrodo convencional. As pequenas dimensões do ume fazem com que a velocidade do transporte de massa por difusão seja maior do que para um eletrodo convencional, o que, por sua vez, faz com que o estado estacionário seja atingido mais rapidamente. Em contrapartida, a velocidade do transporte de massa por convecção, se comparada à por difusão, é negligenciável, permitindo que medidas em fluxo sejam realizadas<sup>44,82</sup>.

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, se uma espécie eletroativa se faz ausente. Nesse caso, ao aplicar uma diferença de potencial ( $\Delta E$ ) durante um dado tempo t surge uma corrente capacitiva,  $i_C$ , representada por:

$$i_C = (\Delta E/R) \exp (-t/RC) \quad [4]$$

No entanto, caso haja na solução uma espécie eletroativa, surgirá também uma corrente faradaica,  $i_F$ , o que resultará em uma corrente total dada pela soma de  $i_F$  e  $i_C$ . No estado estacionário,  $i_F$  é diretamente proporcional ao raio de um eletrodo de disco ao quadrado, ou seja, em relação a um eletrodo convencional, a razão ( $i_F/i_C$ ) é maior em um ume, favorecendo a análise de traços<sup>44</sup>.

Para um ume de disco, a expressão da corrente limite,  $i_{lim}$ , é dada por:

$$i_{lim} = 4nrFDC \quad [5]$$

onde n é o número de elétrons envolvidos na reação redox, r é o raio do ume, F é a constante de Faraday, e D e C são, respectivamente, o coeficiente de difusão e a concentração da espécie eletroativa na solução<sup>44</sup>.

No que diz respeito ao formato e material dos ume, é possível encontrá-los nas mais diversas formas geométricas, como disco, tubular, anel e esfera/hemisfera<sup>81,82</sup>, e em diversos materiais, como Pt, Cu, Au e C<sup>81</sup>.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. MATERIAIS

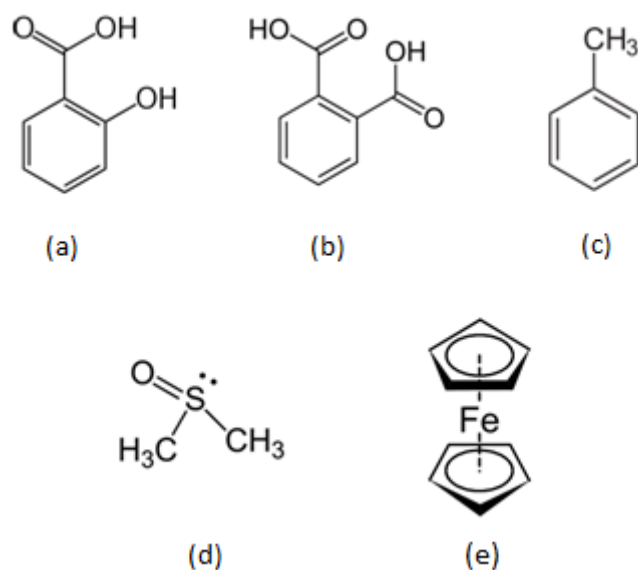
O biodiesel de óleo de soja usado nos experimentos foi cedido por uma usina do município de Passo Fundo/RS. Outros reagentes utilizados foram: *n*-pentanol (Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$ ), dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês, *sodium dodecyl sulfate*) (Invitrogen, 99,5%), tolueno (Merck,  $\geq 99,5\%$ ), dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck,  $\geq 99,5\%$ ), hidróxido de sódio (Synth, 97%), ácido salicílico (Merck, PA), ácido ftálico (Carlo Erba Milano,  $\geq 99\%$ ), tetraborato de sódio anidro (TBS) (Ecibra, 99,95%), ferroceno (Fluka,  $\geq 98\%$ ),  $\gamma$ -ciclodextrina (Merck, 98%) e água deionizada previamente destilada. Os antioxidantes empregados foram TBHQ (Fluka,  $\geq 98\%$ ), BHA (Sigma-Aldrich,  $\geq 98\%$ ), BHT (Fluka,  $\geq 99\%$ ) e PG (Sigma-Aldrich,  $\geq 98\%$ ).

Utilizou-se um aparelho para CE Agilent Technologies 7100 Capillary Electrophoresis com detector UV-Vis e arranjo de diodo. Foi empregado um capilar de sílica fundida, revestido com poliamida, com 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno (i.d., do inglês *internal diameter*) e 48,5 cm de comprimento, sendo 40 cm até o detector (comprimento efetivo, e.i., do inglês *effective length*). Membranas de politetrafluoroetileno (PTFE) de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$  (CHROMAFIL Xtra) foram empregadas na filtragem das soluções injetadas na coluna. Nas medidas voltamétricas foi utilizado um potenciostato/galvanostato  $\mu\text{AUTOLAB TYPE III}$  com o software GPES (do inglês, *General Purpose Electrochemical System*). Como célula eletroquímica para análise voltamétrica, utilizaram-se três eletrodos, sendo eles um um de Pt (PAR,  $r = 5 \mu\text{m}$ ) como eletrodo de trabalho e duas fitas de Pt como contra-eletrodo e quase-referência, sendo as medidas realizadas em uma gaiola de Faraday, à 25 °C.

As medidas de condutividade foram realizadas em um condutivímetro Metrohm 712 Conductometer, com constante de célula 1  $\text{cm}^{-1}$ , calibrado com solução de KCl 0,01  $\text{mol L}^{-1}$  (1,413  $\text{mS cm}^{-1}$  à 25 °C).

Os espectros de absorção no UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50 UV-Visible Spectrophotometer, na faixa de comprimentos de onda de 200 a 800 nm.

Na Figura 11 estão representadas as estruturas dos ácidos salicílico e ftálico (padrões internos nas análises por CE), bem como do tolueno e DMSO (solutos-sonda nas análises por CE) e ferroceno (sonda eletroquímicas nas medidas voltamétricas).



**Figura 11.** (a) Ácido salicílico; (b) Ácido ftálico; (c) Tolueno; (d) DMSO; (e) Ferroceno.

## 3.2. METODOLOGIA

### 3.2.1. Medidas por Eletroforese Capilar

Antes e após as medidas, a limpeza do capilar foi realizada com NaOH 1 e 0,1 mol L<sup>-1</sup> e água deionizada, por 5 minutos cada. Além disso, ao finalizar as medidas, o capilar era seco com fluxo de ar. Para o pré-condicionamento do capilar entre cada medida, utilizaram-se soluções de NaOH 1 e 0,1 mol L<sup>-1</sup>, água deionizada e o eletrólito de corrida, sendo cada uma injetada no capilar durante 5 minutos. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente por 5 s a 50 mbar, sob um potencial de -30 kV, corrente de 300 μA e potência de 6 W, à 25 °C.

Todas as soluções injetadas foram previamente filtradas com membrana de PTFE de porosidade 0,45 μm.

#### 3.2.1.1. Preparo do Eletrólito de Corrida

O eletrólito de corrida consistiu de uma ME a/o composta de 74% de pseudo-fase (SDS/*n*-pentanol 1:4 m/m) e 26% de tampão TBS 5x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, apresentando características similares às amostras microemulsionadas a fim de não desestabilizar o *plug* da amostra no interior do capilar.

### 3.2.1.2. Preparo das Microemulsões

Foram empregadas ME a/o de biodiesel (com e sem adição de antioxidante) contendo 20% de biodiesel, 20% de água e 60% de pseudo-fase (48% de *n*-pentanol e 12% de SDS). Essa microemulsão foi empregada na preparação de uma microemulsão diluição, ME<sub>D</sub>, e de uma microemulsão estoque, ME<sub>E</sub>, contendo o antioxidante TBHQ em estudo na concentração de  $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; as microemulsões com concentrações mais baixas de antioxidante foram obtidas por diluição da ME<sub>E</sub> com a ME<sub>D</sub>.

### 3.2.1.3. Preparo das ME a/o contendo Ácidos Salicílico e Ftálico como Padrões Internos

As ME a/o contendo somente ácido salicílico na concentração  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foram preparadas da mesma forma descrita no item 3.2.1.2. Empregando essa microemulsão, foram obtidas ME a/o com concentrações variáveis de antioxidante, por adição de volumes conhecidos da ME<sub>E</sub> mantendo-se constante a concentração do ácido salicílico. Posteriormente, o ácido ftálico foi adicionado como segundo padrão interno, também na concentração de  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , sendo as microemulsões preparadas da mesma forma.

## 3.2.2. Medidas Eletroquímicas

### 3.2.2.1. Voltametria de Pulso Diferencial

Para investigar o comportamento eletroquímico do TBHQ nas microemulsões utilizadas nas análises por CE, foram realizadas medidas de voltametria de pulso diferencial, na ausência e presença de  $1,20 \times 10^{-3}$ ,  $2,40 \times 10^{-3}$ ,  $3,60 \times 10^{-3}$ ,  $4,80 \times 10^{-3}$  e  $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  do antioxidante. As amostras foram medidas em triplicata com varreduras realizadas a um potencial inicial de 0,000 V e final de 1,800 V e amplitude de 100 mV.

O primeiro experimento consistiu de uma análise da variação da concentração de TBHQ na microemulsão. Para tal, preparou-se uma microemulsão composta por 60% de pseudo-fase, 20% de água e 20% de biodiesel, sendo separada uma alíquota para a medida do branco; à outra alíquota adicionou-se TBHQ na concentração  $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e, a partir dessa concentração, obtiveram-se concentrações mais baixas de TBHQ por diluição com a microemulsão sem antioxidante.

O segundo experimento foi uma análise da variação da concentração de TBHQ na mesma microemulsão em presença de ferroceno à  $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , seguindo procedimento similar ao anterior.

Em seguida foi feita uma análise da variação da concentração de ferroceno na microemulsão em presença de  $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ. Igualmente, preparou-se a microemulsão como descrito acima e, a uma alíquota da mesma, adicionou-se  $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de TBHQ. O ferroceno foi adicionado à microemulsão, contendo o antioxidante, em uma concentração de  $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  para, a partir desse valor, obter concentrações mais baixas de ferroceno ( $1,00 \times 10^{-3}$ ,  $1,00 \times 10^{-4}$  e  $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) por diluição com a microemulsão contendo apenas TBHQ.

#### 3.2.2.2. Voltametria Potenciodinâmica

Foram realizados três experimentos de voltametria potenciodinâmica com as microemulsões utilizadas no item 3.2.2.1, na faixa de potenciais de -0,800 a 3,000 V e velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

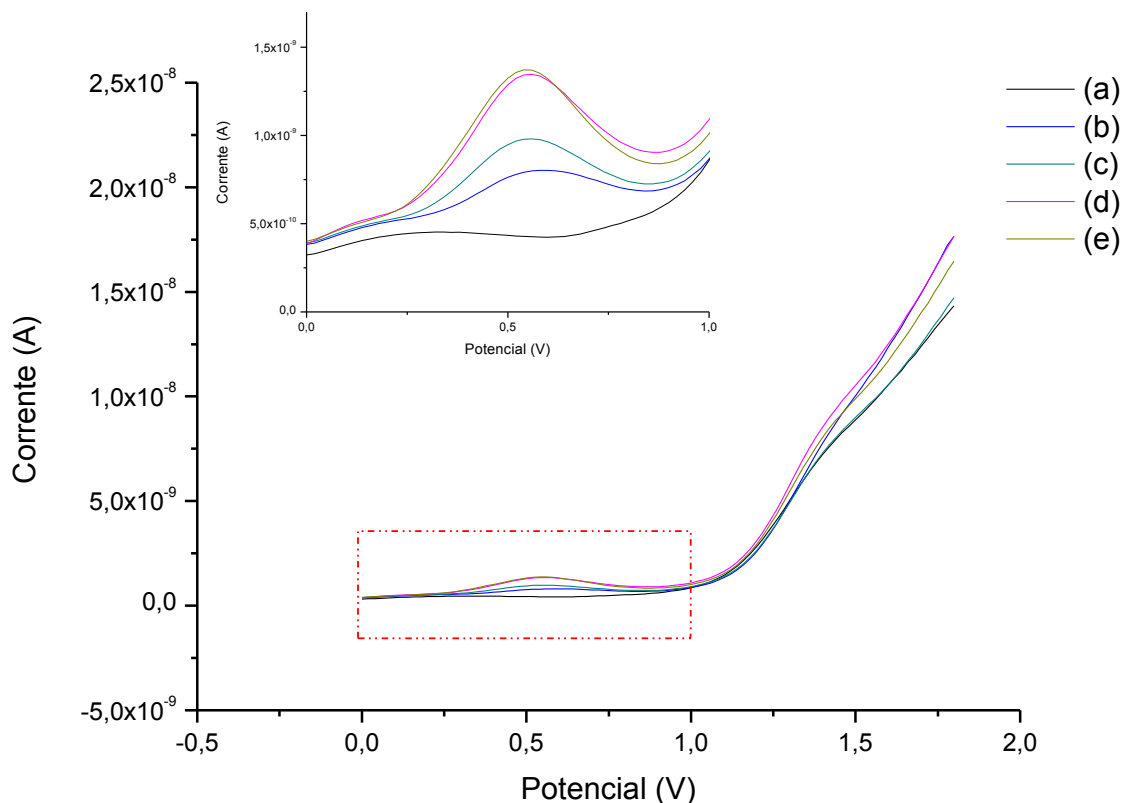
#### 4.1.1. Análise da Variação da Concentração de TBHQ na Microemulsão

As quinonas e hidroquinonas constituem um grupo amplamente investigado no que diz respeito a processos de transferência de prótons e elétrons e, apesar de diversos estudos terem sido realizados com o propósito de elucidar tais mecanismos de reação, novos aspectos de seu comportamento continuam sendo investigados. Um desses estudos é o mecanismo de reação de transferência de prótons e elétrons que ocorre entre as quinonas e/ou hidroquinonas em meios prótico e aprótico<sup>83</sup>.

Para se analisar o comportamento eletroquímico do TBHQ, bem como investigar a sensibilidade das técnicas voltamétricas na detecção do antioxidante em biodiesel, foram feitas varreduras por voltametria de pulso diferencial e voltametria potenciodinâmica na microemulsão em estudo contendo concentrações conhecidas de TBHQ. Trata-se, portanto, de ensaios com adição de padrão TBHQ, permitindo estimar a concentração desse antioxidante na amostra de biodiesel presente na microemulsão.

A Figura 12 mostra os voltamogramas de pulso diferencial na ausência e presença de TBHQ na microemulsão, nas concentrações entre  $2,40 \times 10^{-3}$  e  $6,00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, sendo os potenciais de pico observados em 0,570, 0,550, 0,550 e 0,560 V.

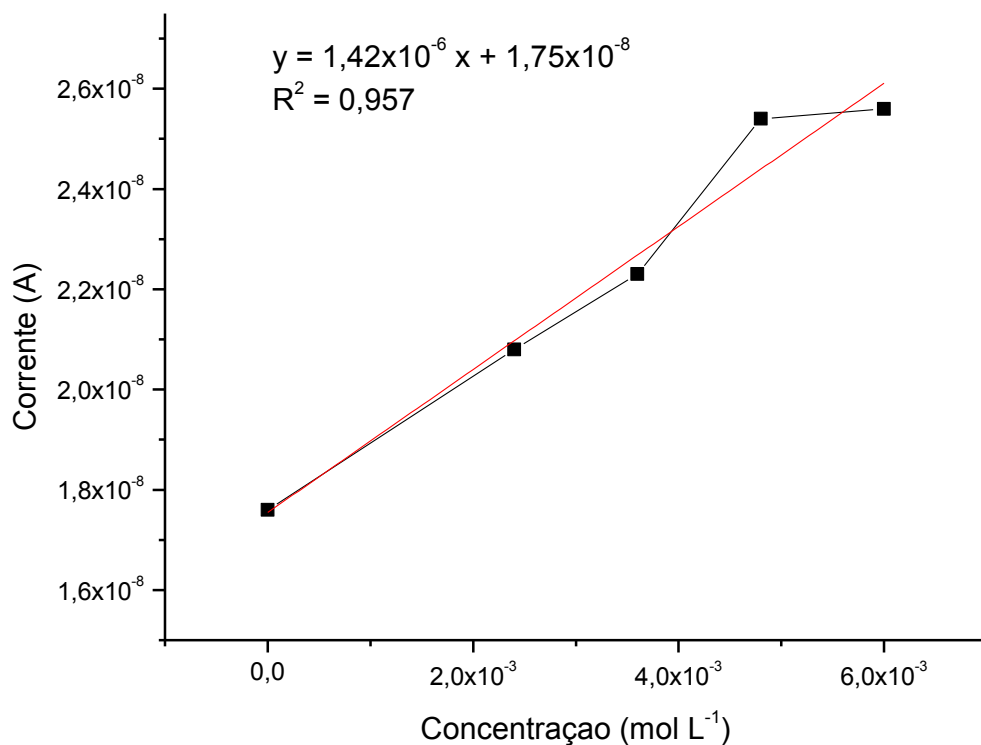




**Figura 12.** Voltamogramas de pulso diferencial do TBHQ na microemulsão de biodiesel nas concentrações: (a) Branco; (b)  $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c)  $3,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d)  $4,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (e)  $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Condições: ume de trabalho ( $r = 5 \text{ }\mu\text{m}$ ), contra-eletrodo e quase-referência de Pt,  $E_i = 0,000\text{V}$ ,  $E_f = 1,800 \text{ V}$ , amplitude de 100 mV.

Pode-se observar um padrão praticamente linear de comportamento da corrente faradaica, que aumenta com o aumento da concentração de TBHQ na microemulsão, o que indica que o antioxidante está sendo oxidado.

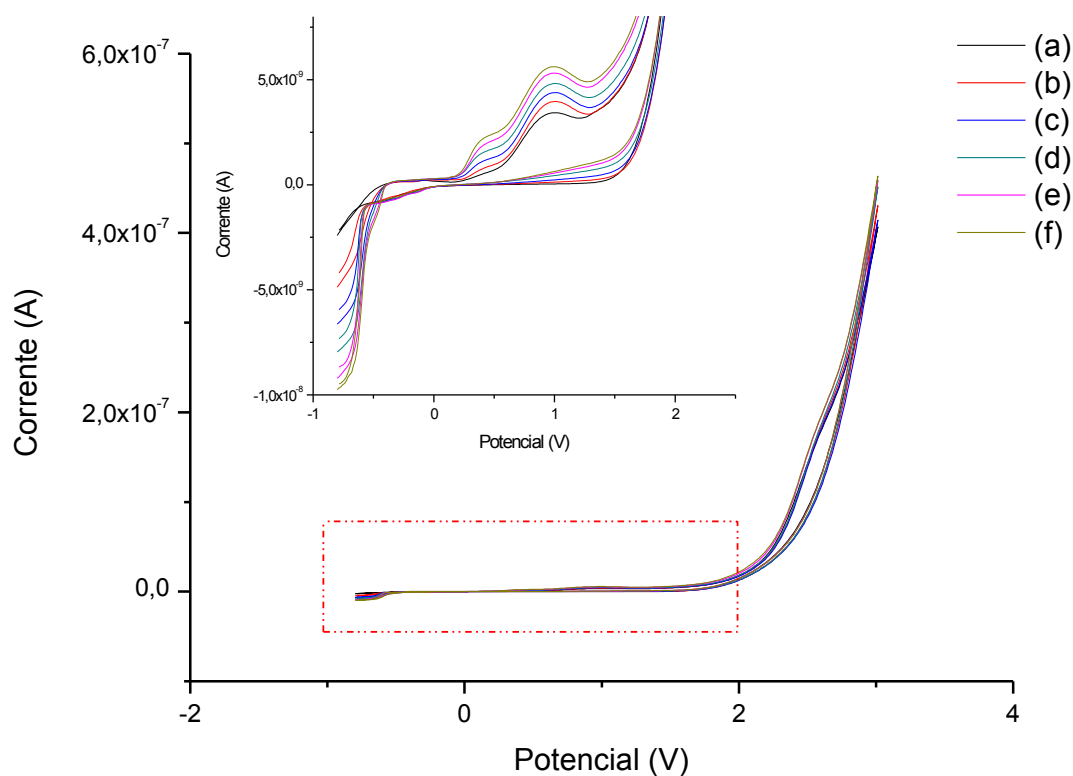
Com base nos dados da Figura 12, foram plotados os valores de concentração  $\times$  corrente (Figura 13) no pico de oxidação em 0,560 V, para se obter a curva analítica e uma estimativa do valor do coeficiente de correlação linear,  $R^2$ .



**Figura 13.** Curva analítica para a microemulsão de biodiesel sem e com TBHQ nas concentrações entre  $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

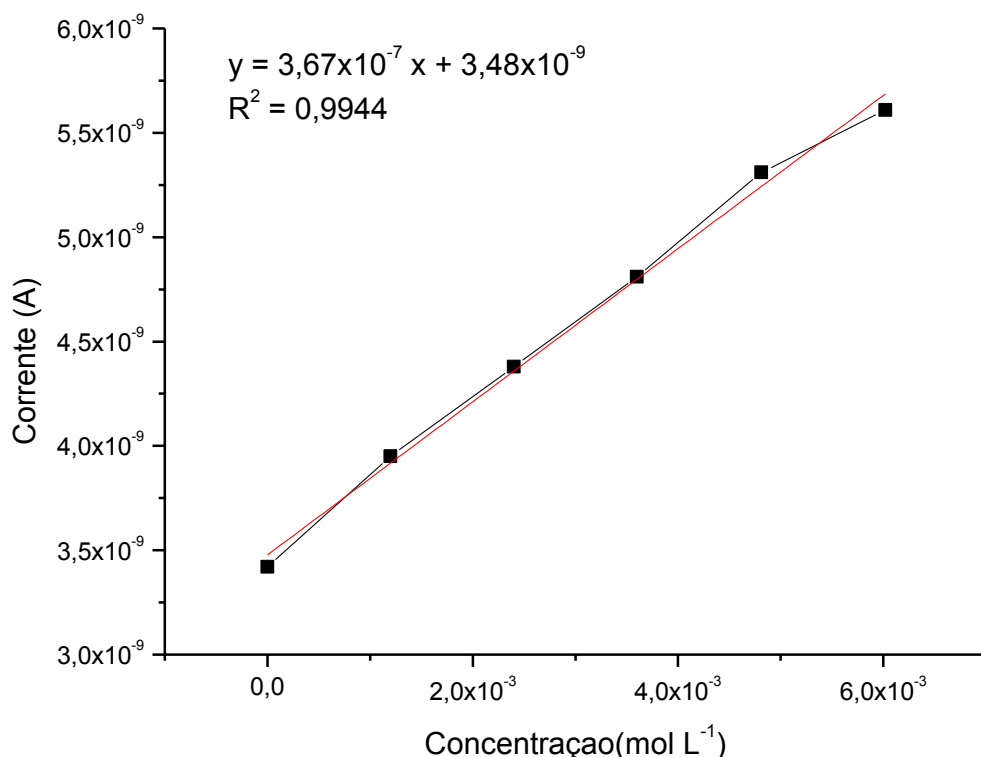
A extrapolação da reta correspondente a esses dados indica uma concentração de antioxidante no biodiesel, possivelmente TBHQ, na ordem de  $4,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , feita a devida correção pelo fator de diluição da amostra.

Em seguida, foram feitas varreduras potenciodinâmicas na mesma amostra, para confirmar a detecção do antioxidante (Figura 14). Pode-se observar duas ondas anódicas nos potenciais de meia-onda 0,280 e 0,760 V, indicando a oxidação da molécula do TBHQ em duas etapas, correspondendo aos dois grupamentos hidroxila, provavelmente em razão do caráter anfiprótico do *n*-pentanol, o qual está presente no meio contínuo da microemulsão, e da possibilidade de formação de ligação hidrogênio. Esses picos aumentam conforme a concentração do antioxidante aumenta, sugerindo que o mesmo é facilmente detectado pela técnica.



**Figura 14.** Voltamogramas potenciodinâmicos do TBHQ na microemulsão de biodiesel nas concentrações: (a) Branco; (b)  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c)  $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d)  $3,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (e)  $4,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (f)  $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Condições: ume de trabalho ( $r = 5 \text{ }\mu\text{m}$ ), contra-eletrodo e quase-referência de Pt,  $E_i = -0,800\text{V}$ ,  $E_f = 3,000 \text{ V}$ , velocidade de varredura  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Pelos dados da Figura 14, plotaram-se os valores de concentração  $\times$  corrente (Figura 15), correspondente à segunda etapa de oxidação em  $1,000 \text{ V}$ , para se obter a curva analítica e o valor do coeficiente de correlação linear,  $R^2$ , evidenciando o aumento linear da corrente com a concentração do antioxidante.



**Figura 15.** Curva analítica para a microemulsão de biodiesel sem e com TBHQ nas concentrações entre  $1,20 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e  $6,00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>.

A extrapolação da reta correspondente a esses dados indica uma concentração de antioxidante no biodiesel, possivelmente TBHQ, na ordem de  $6,50 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, feita a devida correção pelo fator de diluição da amostra.

#### 4.1.2. Análise da Variação da Concentração de TBHQ na Microemulsão em Presença de Ferroceno

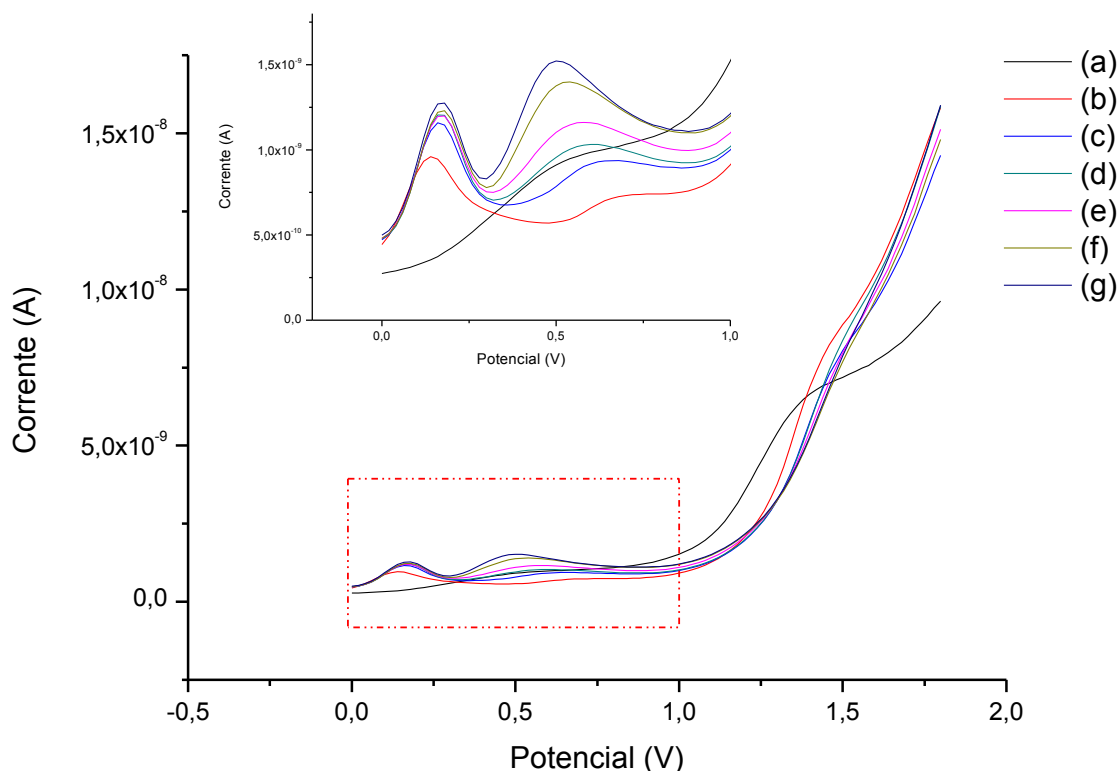
Para definir os potenciais de oxidação do TBHQ em um eletrodo de Pt foram realizados ensaios em presença de ferroceno, o qual se caracteriza por ser uma sonda adequada em meios não-aquosos, devido a sua boa solubilidade nesses meios, baixa solubilidade em água e adsorção negligenciável na superfície do eletrodo<sup>44,84,85</sup>. Adicionalmente, as características das microemulsões não são afetadas significativamente pela presença desse composto<sup>44,86</sup>.

Inicialmente, o ferroceno foi adicionado à microemulsão e mantido em concentração constante ( $2,50 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), enquanto o TBHQ teve sua concentração variada, entre 0,00 e

$6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , com acréscimos de  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para cada amostra. O voltamograma (a) da Figura 16 corresponde a uma varredura da microemulsão na ausência de ferroceno e de TBHQ, enquanto que o voltamograma (b) corresponde a uma microemulsão adicionada de ferroceno. Os resultados mostram que há uma reação anódica na amostra da microemulsão pura, indicando, provavelmente, a presença de algum componente do biodiesel, talvez um antioxidante residual do processo industrial de obtenção do produto.

A partir da curva (b) observa-se um potencial de pico referente ao ferroceno em 0,140 V; o mesmo pico é visto nas outras curvas, de (c) até (g), nas quais as correntes são praticamente constantes. A partir da concentração do TBHQ correspondente ao voltamograma (c), nota-se a presença de um segundo pico anódico em 0,650 V; esses voltamogramas correspondem às sucessivas adições do TBHQ na microemulsão, o que é evidenciado pelo aumento da corrente com a concentração do mesmo.

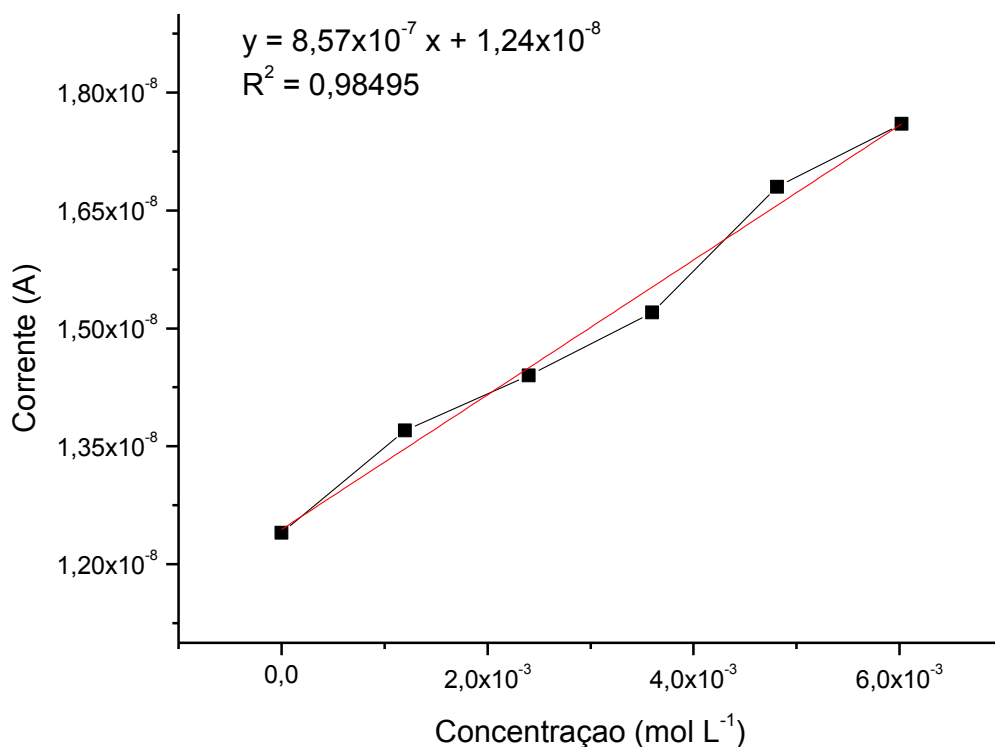
Um ponto importante a ser considerado é o potencial de oxidação do ferroceno no meio em questão. Enquanto no presente trabalho ele foi detectado em um potencial de 0,140 V, em estudos anteriores realizados no laboratório<sup>44</sup> o valor observado foi em torno de 0,500 V. O meio anteriormente estudado consistiu de uma microemulsão composta por 40% de óleo, 6% de água e 54% de pseudo-fase, contra 20% de óleo, 20% de água e 60% de pseudo-fase no presente estudo. Essa diminuição no potencial de oxidação provavelmente é devido ao fato de a condutividade do meio ter aumentado em razão do maior teor de água, bem como da diminuição da quantidade de óleo e, conseqüentemente, da viscosidade do meio, favorecendo a oxidação do ferroceno a um potencial anódico menos positivo. Esses ensaios colocam em evidência a sensibilidade da voltametria de pulso diferencial.



**Figura 16.** Voltamogramas de pulso diferencial do TBHQ na microemulsão de biodiesel contendo ferroceno: (a) Ausência de ferroceno e TBHQ; (b) Ferroceno à  $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Ferroceno à  $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e TBHQ nas concentrações: (c)  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d)  $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (e)  $3,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (f)  $4,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (g)  $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Condições: ume de trabalho ( $r = 5 \mu\text{m}$ ), contra-eletrodo e quase-referência de Pt, amplitude de 100 mV.

Observa-se também que, em concentrações maiores de TBHQ, o pico de oxidação do mesmo é deslocado para valores menos positivos, mostrando que a reação de oxidação ocorre com mais facilidade. Além disso, as correntes de oxidação do ferroceno apresentam valores maiores em presença do antioxidante. Esses acontecimentos demandam estudos mais aprofundados, bem como sugerem que o meio em estudo, uma ME a/o, é de grande complexidade.

Com os valores de corrente encontrados para o pico de oxidação do TBHQ em torno de 0,500 V, plotaram-se os valores de concentração  $\times$  corrente para a obtenção da curva analítica e do valor do coeficiente de correlação linear,  $R^2$ , conforme mostrado na Figura 17.

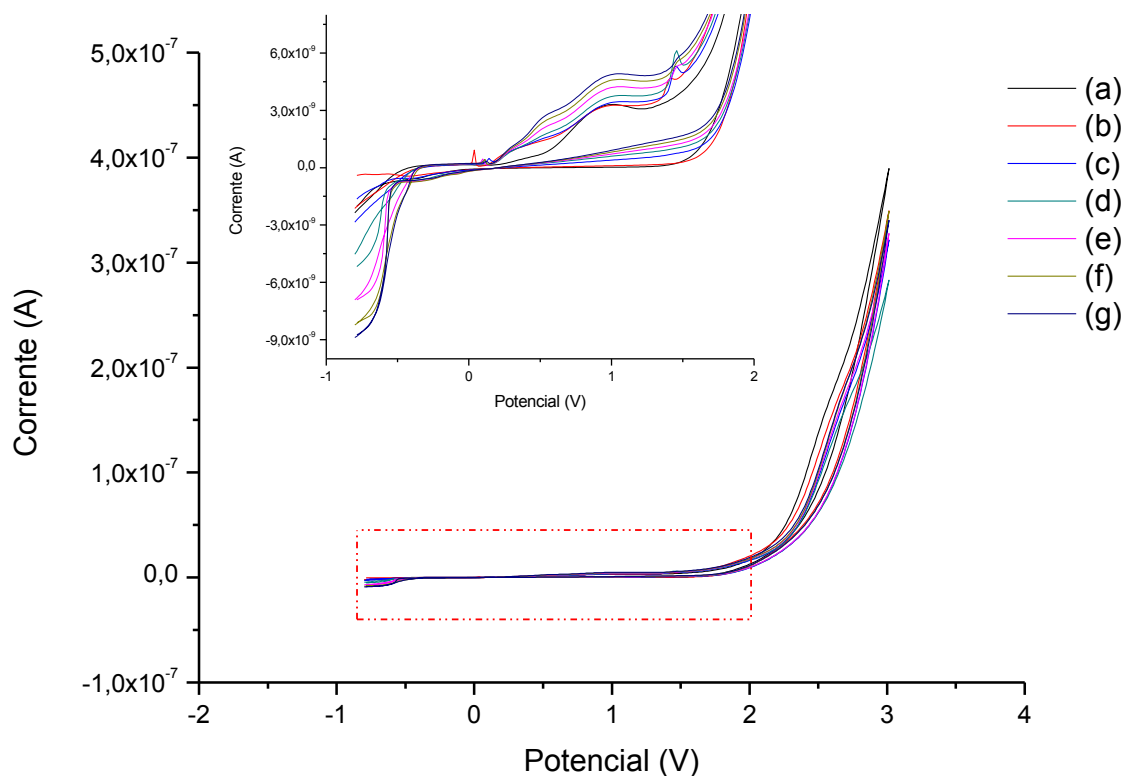


**Figura 17.** Curva analítica para a microemulsão de biodiesel sem e com TBHQ nas concentrações entre  $1,20 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e  $6,00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Presença de ferroceno à  $2,50 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>.

A extrapolação da reta correspondente a esses dados indica uma concentração de antioxidante no biodiesel, possivelmente TBHQ, da ordem de  $8,50 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, feita a devida correção pelo fator de diluição da amostra.

Em seguida, foram feitas, com a mesma microemulsão utilizada nas medidas de pulso diferencial, varreduras potenciodinâmicas (Figura 18). Nota-se, comparando os voltamogramas (a) e (b), que a presença de ferroceno em (b) apresenta um sinal de oxidação em torno de 0,036 V. Esse sinal aparece também nos outros voltamogramas, apresentando correntes anódicas praticamente constantes, uma vez que a concentração do ferroceno é mantida constante em todas as amostras. Observa-se também a presença de dois picos anódicos nos potenciais de meia-onda de 0,450 e 0,820 V, a partir do voltamograma (b). Além disso, pode-se notar um padrão constante do aumento da corrente limite nas duas ondas anódicas com o aumento do teor de TBHQ, sugerindo que sua detecção é possível. Novamente, mesmo o TBHQ estando ausente nas curvas (a) e (b), observam-se correntes de

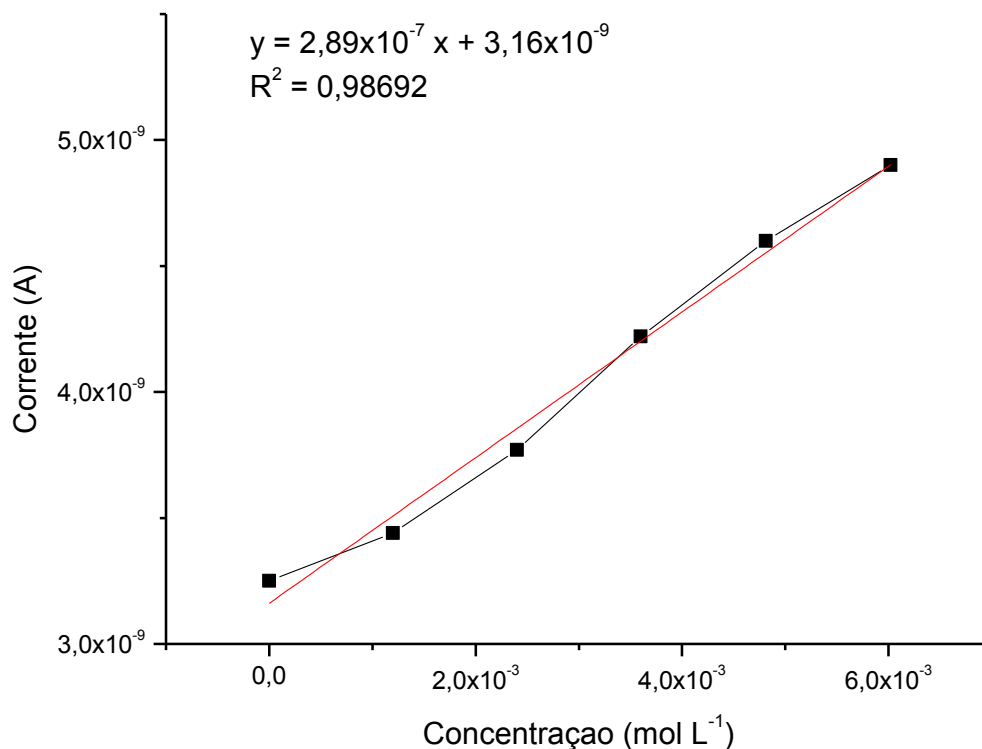
oxidação na mesma região de potenciais de detecção do antioxidante, sugerindo que antioxidantes presentes no biodiesel tenham sido detectados nesses potenciais.



**Figura 18.** Voltamogramas potenciodinâmicos da microemulsão de biodiesel: (a) Ausência de ferroceno ou TBHQ; (b) Ferroceno à  $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Ferroceno à  $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e TBHQ nas concentrações: (c)  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d)  $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (e)  $3,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (f)  $4,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (g)  $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Condições: ume de trabalho ( $r = 5 \mu\text{m}$ ), contra-eletródo e quase-referência de Pt, velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Com base nos valores de corrente encontrados para o pico de oxidação do TBHQ em  $1,000 \text{ V}$  na Figura 18, plotaram-se os valores de concentração  $\times$  corrente, conforme mostrado na Figura 19.





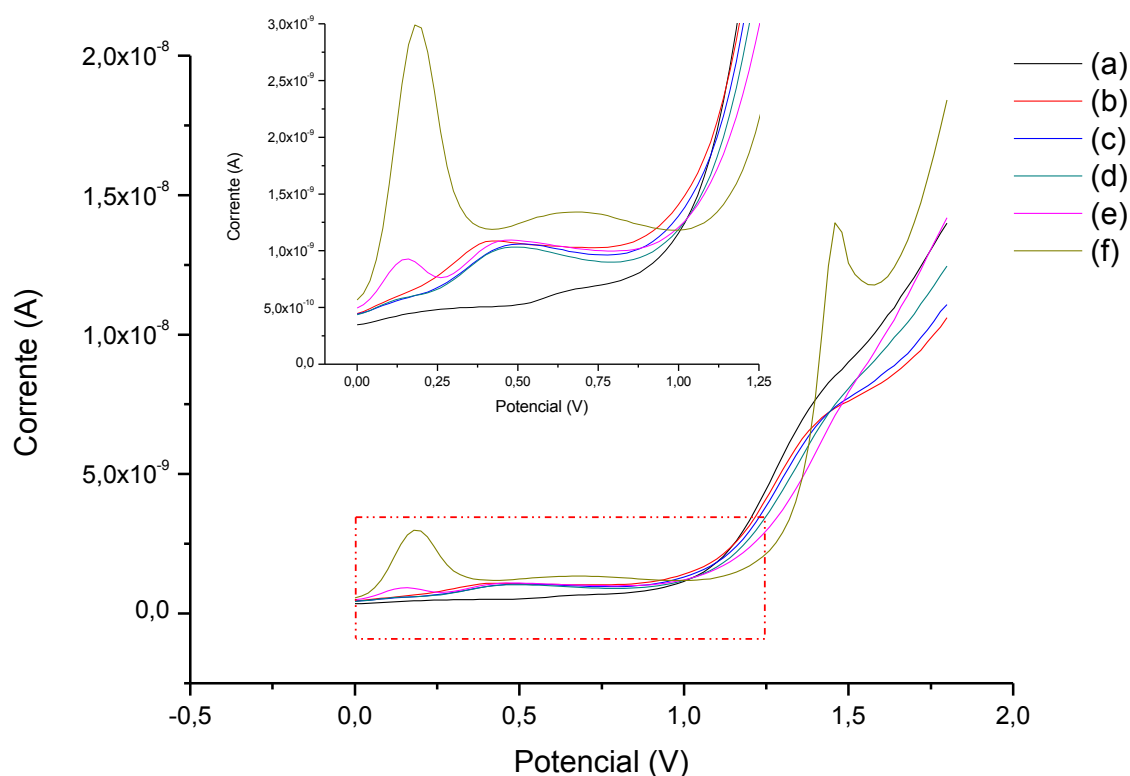
**Figura 19.** Curva analítica para a microemulsão de biodiesel (branco) e concentrações de TBHQ entre  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Presença de ferroceno à  $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Como se pode notar novamente, a linearidade também é baixa assim como as mostradas nas Figuras 13 e 17. A extrapolação da reta correspondente a esses dados indica uma concentração de antioxidante no biodiesel, possivelmente TBHQ, na ordem de  $3,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , feita a devida correção pelo fator de diluição da amostra. Portanto, da mesma ordem de grandeza daquelas determinadas a partir dos dados das Figuras 13, 15 e 17.

#### 4.1.3. Análise da Variação da Concentração de Fc na ME em Presença de TBHQ

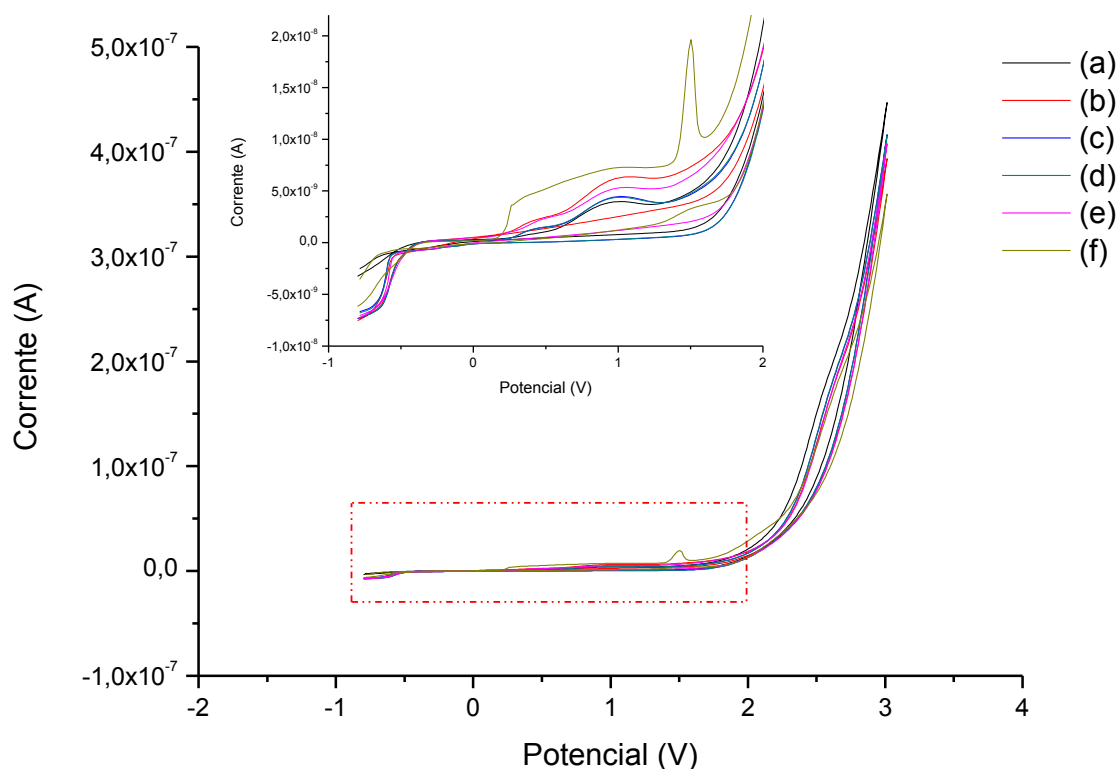
Ensaio por voltametria de pulso diferencial foram realizados variando a concentração de ferroceno e mantendo a concentração de TBHQ constante ( $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). Comparando os voltamogramas (a) e (b) da Figura 20, nota-se a presença em (b) de uma onda de oxidação em torno de 0,500 V, devido à presença do antioxidante; essa onda apresenta correntes anódicas praticamente constantes nos demais voltamogramas, uma vez que a concentração de TBHQ foi mantida constante em todas as microemulsões. Os voltamogramas

(c) a (f) correspondem a adições de ferroceno na microemulsão; o sinal de oxidação do ferroceno não é observado para baixas concentrações e se apresenta como um pico em torno de 0,200 V nos voltamogramas (e) e (f). Observa-se, ainda, no voltamograma (f), um pico de oxidação em torno de 1,500 V, possivelmente devido a alguma impureza presente na amostra.



**Figura 20.** Voltamogramas de pulso diferencial da microemulsão de biodiesel: (a) Ausência de TBHQ ou ferroceno; (b) TBHQ à  $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; TBHQ à  $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e ferroceno nas concentrações: (c)  $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d)  $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; (e)  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (f)  $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . Condições: ume de trabalho ( $r = 5 \text{ }\mu\text{m}$ ), contra-eletrodo e quase-referência de Pt, amplitude de 100 mV.

Também foram feitas varreduras potenciodinâmicas na mesma amostra, obtendo-se os seguintes voltamogramas (Figura 21):



**Figura 21.** Voltamogramas potenciodinâmicos da microemulsão de biodiesel: (a) Ausência de TBHQ ou ferroceno; (b) TBHQ à  $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; TBHQ à  $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e ferroceno nas concentrações: (c)  $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d)  $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; (e)  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (f)  $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . Condições: uma de trabalho ( $r = 5 \text{ }\mu\text{m}$ ), contra-eletrodo e quase-referência de Pt, velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Observam-se duas ondas de oxidação nos potenciais de meia-onda em torno de 0,340 e 0,780 V em todas as curvas, inclusive na que não contém TBHQ. Na curva (f) ainda é possível observar a presença do pico de oxidação em 1,500 V, atribuído a alguma impureza na amostra.

Comparando os voltamogramas de pulso diferencial com os voltamogramas potenciodinâmicos, nota-se que aqueles apresentaram apenas um pico de oxidação para o TBHQ, enquanto os últimos apresentaram duas ondas anódicas. Provavelmente a técnica de pulso detectou a oxidação do TBHQ em duas etapas, assim como a potenciodinâmica, no entanto, o aparecimento de apenas um pico sugere a ocorrência de uma convolução.

A Tabela I resume os resultados comparativos das curvas analíticas obtidas nos ensaios realizados, observando-se uma boa concordância entre eles, quer por voltametria de pulso diferencial ou potenciodinâmica, em presença ou ausência de ferroceno.

**Tabela I.** Concentrações de TBHQ e coeficientes de correlação linear determinados em diferentes condições experimentais, conforme legenda das figuras indicadas

<b>Curva analítica</b>	<b>Concentração de antioxidante (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Coefficiente de correlação linear (R<sup>2</sup>)</b>	<b>Ferroceno</b>	<b>Técnica voltamétrica</b>
Figura 13	4,00x10 <sup>-3</sup>	0,957	Ausente	Pulso Diferencial
Figura 15	6,50x10 <sup>-3</sup>	0,9944	Ausente	Potenciodinâmica
Figura 17	8,50x10 <sup>-3</sup>	0,98495	Presente	Pulso Diferencial
Figura 19	3,50x10 <sup>-3</sup>	0,98692	Presente	Potenciodinâmica

Os resultados dos experimentos descritos pelas Figuras 13 e 15, nos quais o ferroceno está ausente, evidenciam a maior sensibilidade da técnica de pulso. Por outro lado, pelos resultados descritos pelas Figuras 17 e 19, nas quais o ferroceno está presente, a técnica potenciodinâmica apresentou uma maior sensibilidade. Comparando os valores dos coeficientes de correlação linear mostrados na Tabela I, observa-se que a voltametria potenciodinâmica mostrou o melhor valor, independente se na ausência ou presença do ferroceno.

Ainda que preliminares, os resultados encontrados por extrapolação da concentração do antioxidante são da mesma ordem de grandeza e indicam, apesar de uma provável interferência do ferroceno, que a determinação voltamétrica de TBHQ em microemulsão de biodiesel é viável.

## **4.2. ELETROFORESE CAPILAR**

### **4.2.1. Estudos de Condutividade das Microemulsões**

Para melhor caracterizar o meio solvente empregado na CE, mediu-se a condutividade elétrica das microemulsões e amostras utilizadas, anteriormente a qualquer medida, a fim de

verificar a possibilidade de ocorrência do efeito *stacking*. Os resultados são mostrados na Tabela II.

**Tabela II.** Condutividade elétrica das amostras analisadas por CE

Solução	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )
Água deionizada	68,43
Tampão aquoso TBS $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	613,8
Eletrólito de corrida	1365,0
Biodiesel	37,06
ME a/o [74% pseudo-fase, 26% água]	1261,0
ME a/o [60% pseudo-fase, 20% água, 20% biodiesel]	519,2
ME* + ácido salicílico <sup>1</sup>	431,6
ME* + ácido salicílico + ácido ftálico <sup>1</sup>	445,2
ME* + ácido salicílico + TBHQ <sup>2</sup>	444,9
ME* + ácido salicílico + ácido ftálico + TBHQ	463,2
ME* + ácido salicílico + PG <sup>2</sup>	325,3
ME* + ácido salicílico + ácido ftálico + PG	452,6
ME* + ácido salicílico + ácido ftálico + TEA <sup>3</sup>	455,3
ME* + ácido salicílico + ácido ftálico + TEA + PG	438,2
ME* + ácido salicílico + ácido ftálico + TEA + TBHQ	461,7

\*MEs com biodiesel.

<sup>1</sup> Ácidos salicílico e ftálico na concentração de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  cada.

<sup>2</sup> TBHQ e PG à  $5,85 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  cada.

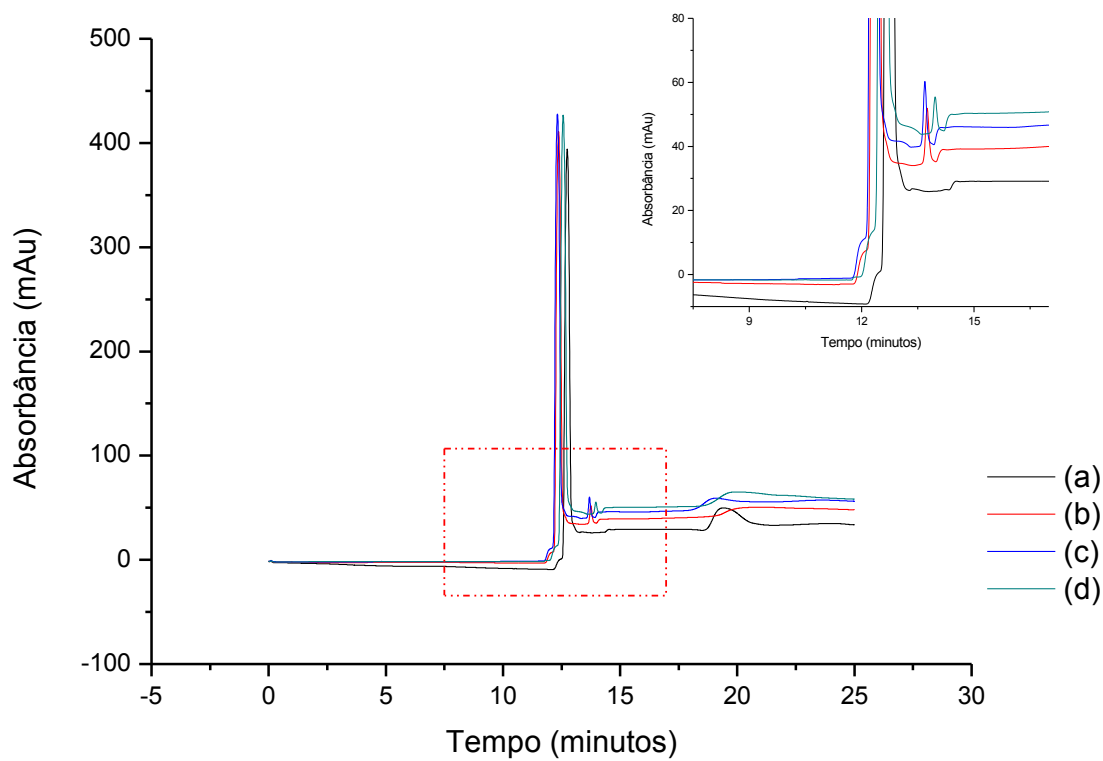
<sup>3</sup> TEA à 5% da concentração dos antioxidantes.

Pode-se observar que as condutividades de todas as microemulsões contendo biodiesel são menores que a condutividade do eletrólito de corrida, o que evita o efeito *antistacking*, ou seja, o alargamento das bandas dos eletroferogramas; desse modo, as microemulsões utilizadas são adequadas para se obter boas resoluções de picos.

#### 4.2.2. Estudos do Fluxo Eletrosmótico e Separação de Solutos-Sonda

A fim de se estudar o EOF existente no capilar, foram empregados dois solutos-sonda já estudados anteriormente<sup>44</sup>, tolueno (marcador hidrofóbico inerte) e DMSO (dipolar

aprótico), ambos solutos neutros, adicionados em diferentes concentrações na microemulsão, na ausência de antioxidante. Os eletroferogramas obtidos são mostrados na Figura 22 a seguir.



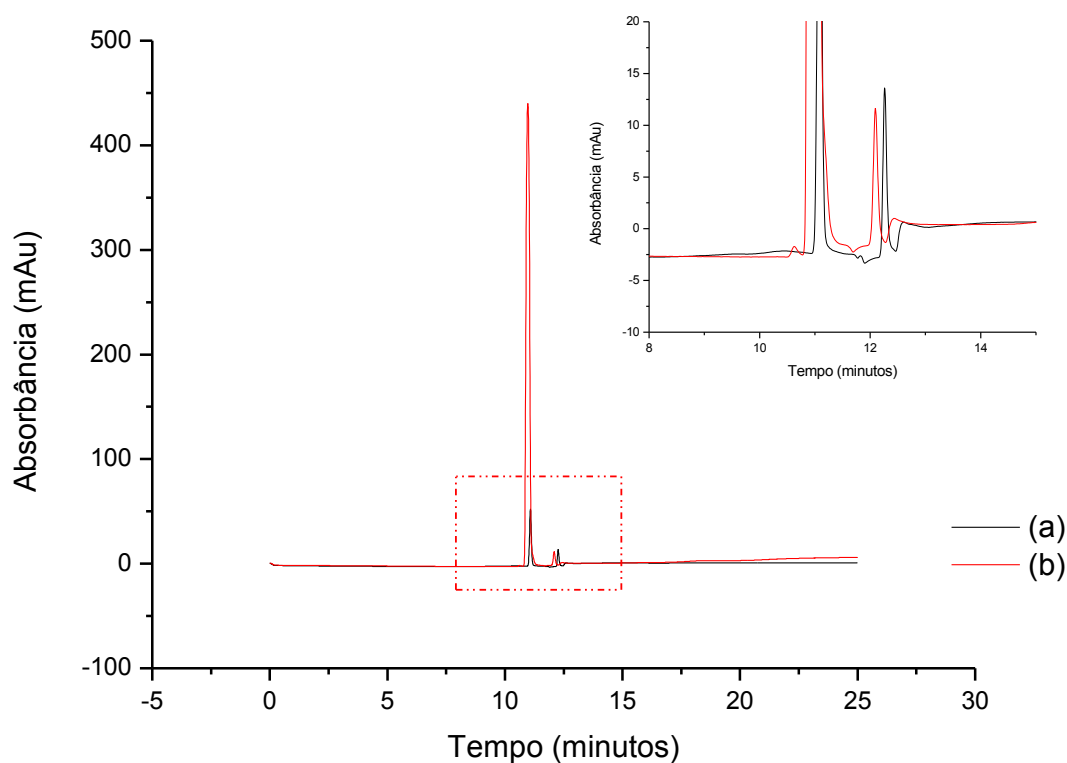
**Figura 22.** Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel: (a) Ausência de DMSO ou tolueno; (b) DMSO à  $6,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c) DMSO à  $1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  e tolueno à  $5,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d) DMSO à  $6,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e tolueno à  $1,10 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem  $-30 \text{ kV}$ ; corrente  $300 \text{ }\mu\text{A}$ ; potência  $6 \text{ W}$ ; temperatura do cassete  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; capilar de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  (i.d.) e  $48,5 \text{ cm}$  (e.l.  $40 \text{ cm}$ ).

Um primeiro pico no tempo de retenção de 12 minutos, com intensidade elevada, é atribuído aos ésteres presentes no biodiesel. Pode-se observar um pico de baixa intensidade em torno de 13,5 minutos no eletroferograma (b), estando ausente no eletroferograma (a), o qual corresponde ao branco. O mesmo pico também está presente nos eletroferogramas (c) e (d), em diferentes intensidades, devido às diferenças nas concentrações com que o analito foi adicionado, indicando que esse pico diz respeito ao DMSO. O tolueno não é detectado isoladamente, porém os picos que aparecem em torno de 12 minutos nos quatro eletroferogramas tem sua intensidade aumentada nos eletroferogramas (c) e (d), os quais

correspondem às microemulsões contendo tolueno, indicando que ele se desloca juntamente com os ésteres do biodiesel, previamente ao DMSO.

Em estudo anterior<sup>44</sup> verificou-se que, em microemulsões constituídas por água, SDS e *n*-pentanol, ou seja, com fase contínua polar (PCP, do inglês *polar continuous phase*), as gotículas têm uma mobilidade catódica líquida, e, em consequência, o mecanismo de partição entre as fases contribui para a separação dos solutos neutros. Utilizando essa microemulsão no modo de polaridade reversa (cátodo na extremidade de entrada do capilar e ânodo próximo do detector), os cátions aprisionados dentro das gotículas sofrem um retardo de tempo em relação aos solutos neutros hidrofóbicos. Solutos neutros e aniônicos (se estiverem presentes na fase contínua) são acelerados em direção ao detector, tanto mais quanto maior a hidrofobicidade do soluto e, em razão da carga, os ânions migram primeiro. De acordo com esse estudo, a separação de solutos neutros em ME a/o de PCP se daria por partição entre as fases em um meio onde as gotículas de água têm uma carga líquida positiva, portanto, uma mobilidade catódica; haveria, ainda, a associação dos solutos hidrofóbicos com os íons livres do surfactante na fase contínua.

Para confirmar essa hipótese, foi avaliado o comportamento de duas microemulsões, na ausência e presença de biodiesel, ambas com os solutos-sonda tolueno e DMSO. Os eletroferogramas obtidos estão representados na Figura 23.



**Figura 23.** Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel: (a) Ausência e (b) Presença de biodiesel, contendo  $1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de DMSO e  $1,10 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de tolueno. Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem  $-30 \text{ kV}$ ; corrente  $300 \mu\text{A}$ ; potência  $6 \text{ W}$ ; temperatura do cassete de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; capilar de  $50 \mu\text{m}$  (i.d.) e  $48,5 \text{ cm}$  (e.l.  $40 \text{ cm}$ ).

Os eletroferogramas (a) e (b) mostram um pico de intensidade baixa e constante em torno de 12 minutos e outro em torno de 11 minutos, de baixa intensidade, no eletroferograma (a), tendo sua altura aumentada abruptamente na presença do biodiesel, confirmando a hipótese de que esse pico corresponde ao tolueno e o segundo pico ao DMSO.

Analisando a estrutura da ME a/o utilizada, em que o biodiesel encontra-se na fase contínua da microemulsão, sugere-se que o tolueno, sendo um marcador hidrofóbico, também se encontra, preferencialmente, nessa fase. Já o DMSO, por possuir hidrofiliabilidade maior que o tolueno, possivelmente sofre partição com as gotículas da microemulsão, e, conseqüentemente, seu sinal aparece após o sinal do tolueno<sup>44</sup>.

Um ponto importante a se observar é que o uso de polaridade negativa causa uma inversão na posição do cátodo e do ânodo; com tal polaridade, o ânodo passa a estar

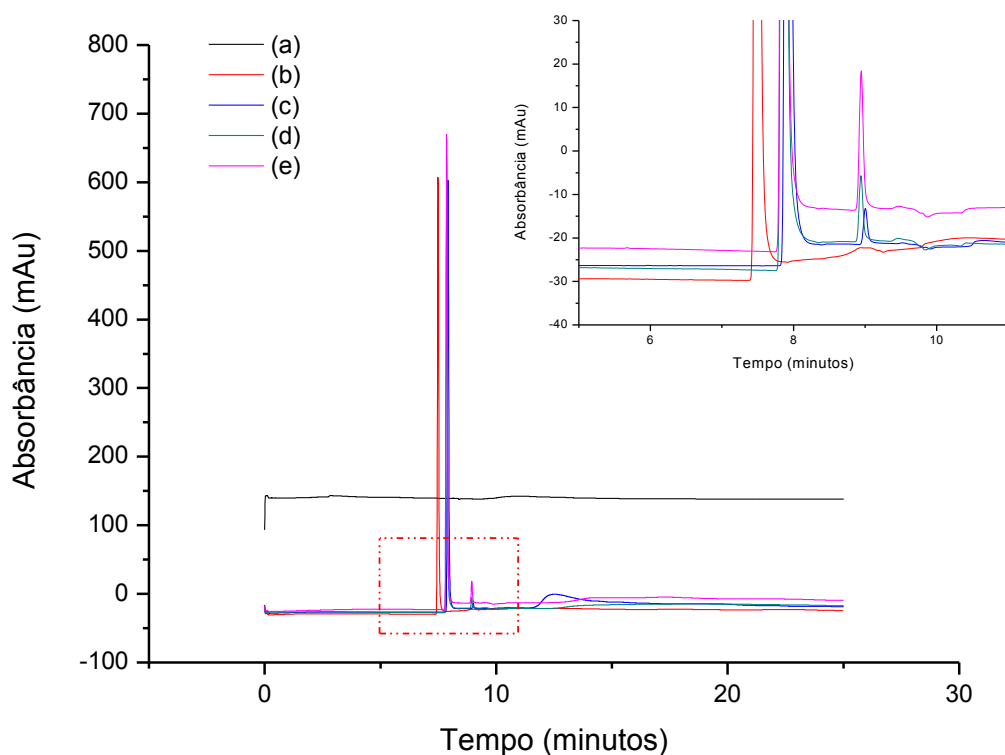


localizado próximo ao detector. Como já discutido, o tolueno apresenta um tempo de migração menor se comparado ao DMSO e, uma vez que ele se encontra na fase contínua da microemulsão, tem-se que essa fase possui velocidade de deslocamento no capilar maior do que a das gotículas da microemulsão, as quais são retardadas pelo cátodo; desse modo, os solutos que estão localizados na fase contínua chegarão mais rapidamente ao detector. Consequentemente, o EOF está direcionado para o ânodo, fato confirmado por experimentos anteriores no laboratório<sup>44</sup>.

De acordo com os resultados experimentais obtidos no presente trabalho, no que diz respeito aos tempos de migração dos solutos-sonda tolueno e DMSO, o EOF está direcionado para o ânodo, o que sugere uma complexidade maior do que para ME o/a no que se refere aos mecanismos de separação no interior do capilar.

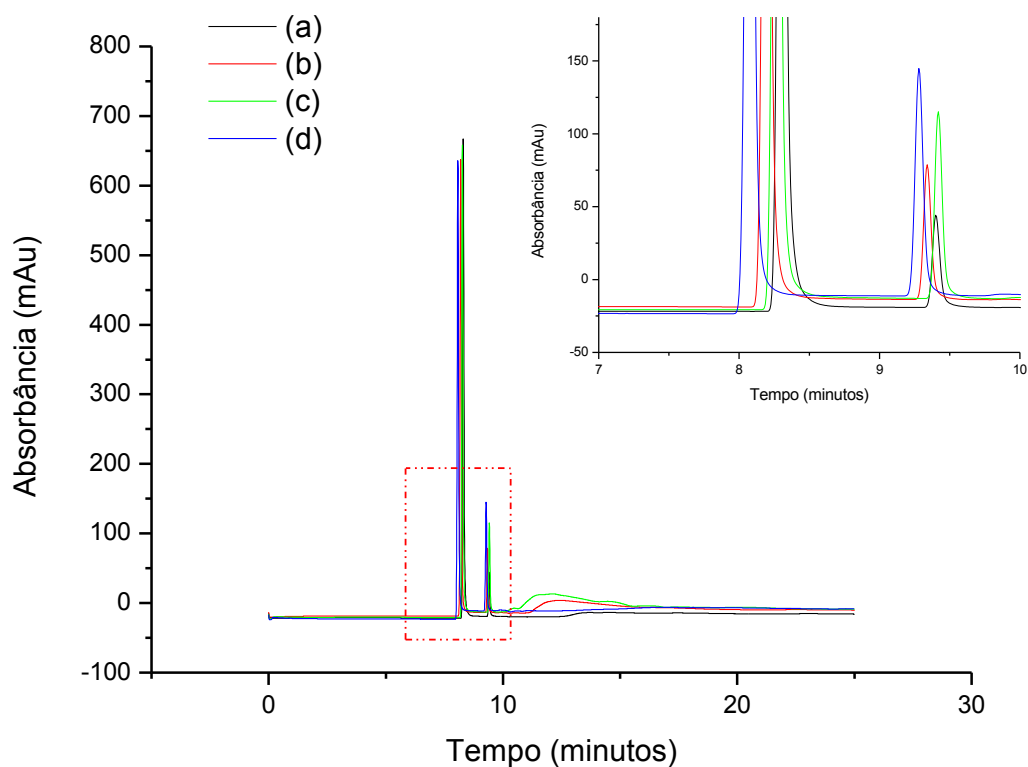
#### **4.2.3. Determinação de TBHQ por CE em ME a/o**

Inicialmente, fez-se uma avaliação da adequação da técnica de CE para detectar o antioxidante na ausência do efeito da matriz de biodiesel. Para tal, injetou-se uma amostra de uma microemulsão, na ausência de biodiesel, com 74% de pseudo-fase e 26% de água. Na Figura 24 são mostrados os eletroferogramas correspondentes a diferentes concentrações de TBHQ presentes na microemulsão, na ausência de biodiesel e presença do padrão interno ácido salicílico; observam-se dois picos, sendo um de altura relativamente constante em torno de 8 minutos e outro, de altura variável, em torno de 9 minutos. O primeiro pico é atribuído ao padrão interno ácido salicílico, por dois motivos: o ácido foi mantido em concentração constante, o que explica a semelhança nas alturas dos picos; por outro lado, a ausência desse pico no branco (eletroferograma “a”), e em seguida sua presença na amostra contendo apenas ele próprio (eletroferograma “b”). O segundo pico, em torno de 9 minutos, apresenta altura crescente com o aumento da concentração do analito; como o TBHQ foi adicionado em concentrações crescentes, tal pico é atribuído ao antioxidante.



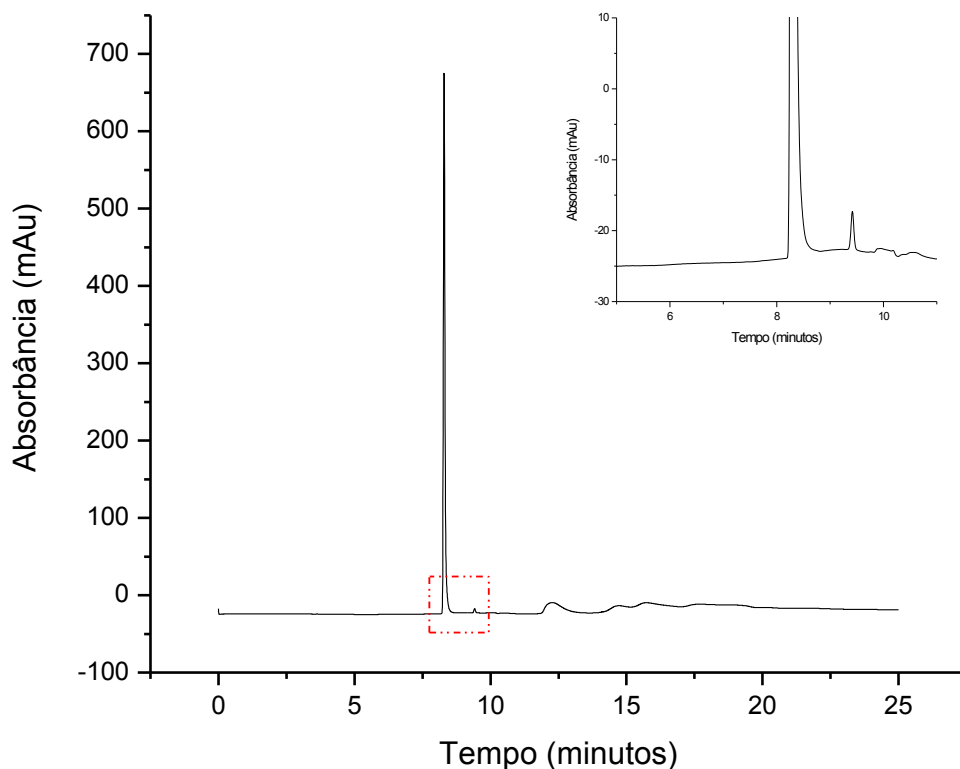
**Figura 24.** Eletroferogramas de microemulsões sem biodiesel: (a) Ausência de padrão ou TBHQ; (b) Ácido salicílico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Ácido salicílico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e TBHQ nas concentrações: (c)  $3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , (d)  $6,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e (e)  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de  $-30 \text{ kV}$ ; corrente de  $300 \mu\text{A}$ ; potência de  $6 \text{ W}$ ; temperatura do cassete de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; capilar de  $50 \mu\text{m}$  (i.d.) e  $48,5 \text{ cm}$  (e.l.  $40 \text{ cm}$ ).

A Figura 25 mostra os eletroferogramas para concentrações maiores de TBHQ na microemulsão. Tais medidas serviram para confirmar que o pico em torno de 9 minutos corresponde, de fato, ao antioxidante.



**Figura 25.** Eletroferogramas de microemulsões sem biodiesel contendo ácido salicílico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e TBHQ nas concentrações: (a)  $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (b)  $3,60 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c)  $4,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d)  $6,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de  $-30 \text{ kV}$ ; corrente de  $300 \mu\text{A}$ ; potência de  $6 \text{ W}$ ; temperatura do cassete de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; capilar de  $50 \mu\text{m}$  (i.d.) e  $48,5 \text{ cm}$  (e.l.  $40 \text{ cm}$ ).

Para avaliar a sensibilidade da técnica, foi analisada uma amostra contendo apenas  $1,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  do antioxidante. O eletroferograma obtido está mostrado na Figura 26 a seguir.



**Figura 26.** Eletroferograma da microemulsão sem biodiesel contendo ácido salicílico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e TBHQ à  $1,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de  $-30 \text{ kV}$ ; corrente de  $300 \text{ }\mu\text{A}$ ; potência de  $6 \text{ W}$ ; temperatura do cassete de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; capilar de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  (i.d.) e  $48,5 \text{ cm}$  (e.l.  $40 \text{ cm}$ ).

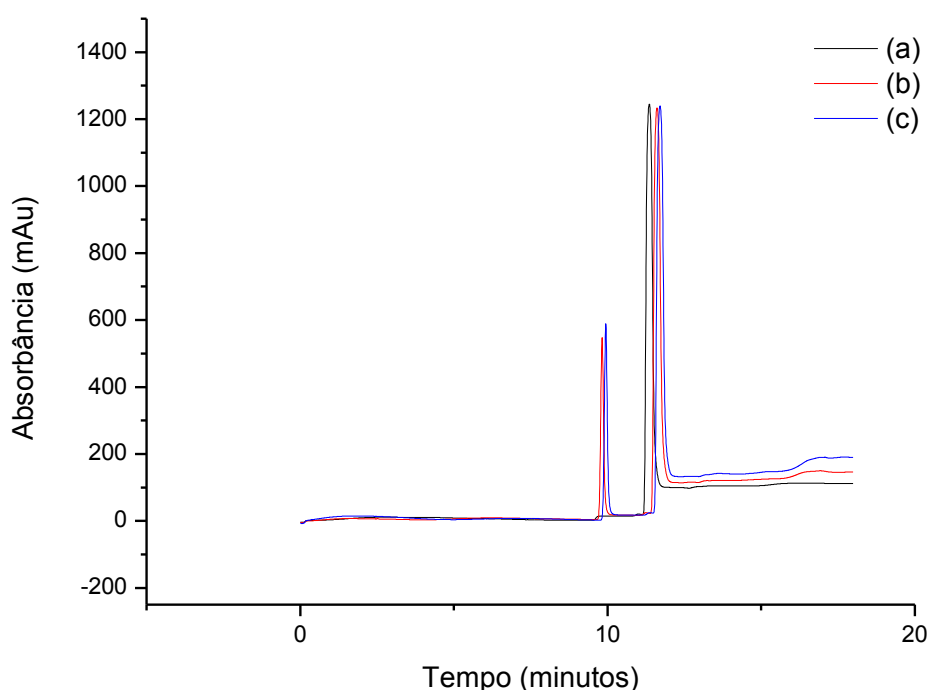
Observa-se um pico de baixa intensidade em torno de 9,5 minutos, correspondente ao antioxidante. Essa capacidade de detectar uma quantidade tão baixa de analito comprova a alta sensibilidade da CE, podendo ser empregada para determinar e quantificar substâncias presentes em níveis extremamente baixos.

A partir desses resultados, que mostraram a possibilidade de determinar antioxidantes nesse meio, passou-se a investigar a resposta do detector na presença da matriz biodiesel, ou seja, em uma microemulsão composta pela pseudo-fase, água e o biocombustível. Foram realizadas medidas nesse meio, na ausência e presença de diferentes concentrações de TBHQ.

Para esse trabalho, foi utilizada uma ME a/o, sendo que o componente em maior quantidade é o *n*-pentanol (48%), solvente polar com permissividade relativa e polarizabilidade intermediárias, resultando em uma microemulsão com PCP. Nesse tipo de

microemulsão há a possibilidade de íons livres estarem presentes na fase contínua, pois podem ser solvatados pela PCP. Desse modo, as cargas negativas do surfactante na interface a/o das gotículas são compensadas pelos cátions no interior das mesmas. Isso resulta em uma mobilidade das gotículas da microemulsão diferente de zero, porém pequena; também, os solutos iônicos solvatados pela PCP poderiam ser separados pela partição entre gotículas e fase contínua. Ainda, como foi observado no item 4.2.2 e de acordo com resultados anteriores obtidos pelo laboratório, o menor tempo de migração do tolueno e o maior tempo de migração do DMSO sugerem que as gotículas são retardadas pelo cátodo<sup>44</sup>.

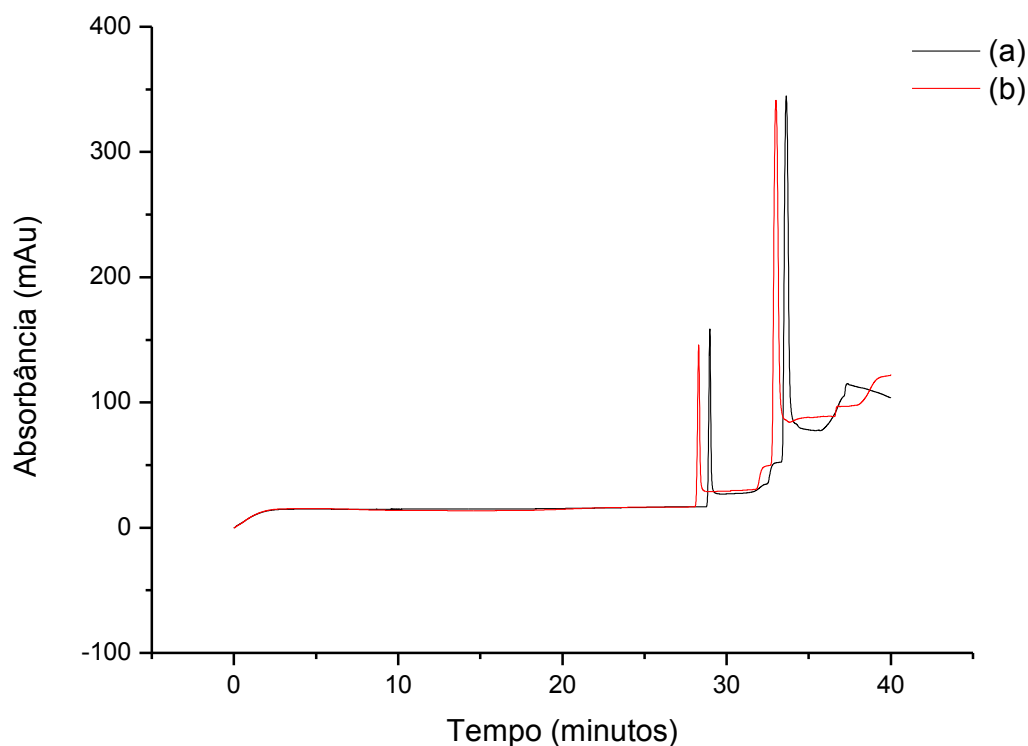
De acordo com a Figura 27 a seguir, o eletroferograma (a), que corresponde à microemulsão sem adição de TBHQ ou do padrão interno ácido salicílico, apresenta um pico bem resolvido em aproximadamente 12 minutos, correspondendo a uma substância já presente no biodiesel. De acordo com a discussão constante no item 4.2.2, o pico em 12 minutos diz respeito, provavelmente, à separação dos ésteres do biodiesel.



**Figura 27.** Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel: (a) Branco; (b) Ácido salicílico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c) Ácido salicílico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e TBHQ à  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de  $-30 \text{ kV}$ ; corrente de  $300 \mu\text{A}$ ; potência de  $6 \text{ W}$ ; temperatura do cassete de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; capilar de  $50 \mu\text{m}$  (i.d.) e  $48,5 \text{ cm}$  (e.l.  $40 \text{ cm}$ ).

O eletroferograma (b) apresenta dois picos bem resolvidos, um em torno de 10 minutos e outro em torno de 12 minutos; o primeiro corresponde ao padrão interno ácido salicílico, ausente no eletroferograma (a), o qual não continha o padrão. O segundo pico é equivalente ao observado no eletroferograma (a), estando também presente no eletroferograma (c), que corresponde à microemulsão contendo TBHQ.

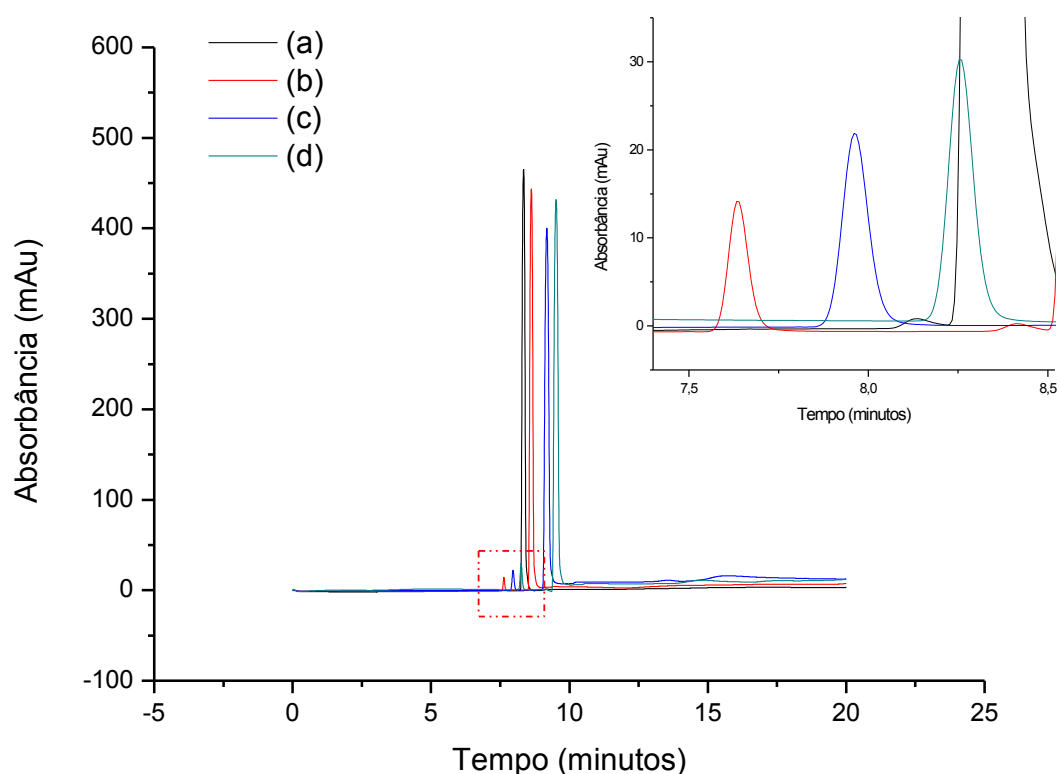
Esperar-se-ia o aparecimento de um terceiro pico correspondente ao antioxidante, o que, no entanto, não ocorreu. Uma hipótese seria que o antioxidante saísse em um tempo maior, ou seja, acima de 20 minutos; sendo assim, foram feitas novas análises, com as mesmas microemulsões, para obter os eletroferogramas da Figura 27, com um novo tempo de corrida (40 minutos) e um capilar de maior comprimento (e.l. 72 cm). Os resultados são mostrados na Figura 28.



**Figura 28.** Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel com ácido salicílico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ : (a) Ausência de TBHQ; (b) TBHQ à  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de  $-30 \text{ kV}$ ; corrente de  $300 \mu\text{A}$ ; potência de  $6 \text{ W}$ ; temperatura do cassete de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; capilar de  $50 \mu\text{m}$  (i.d.) e  $80 \text{ cm}$  (e.l.  $72 \text{ cm}$ ).

Pode-se observar, na Figura 28, a presença dos mesmos picos obtidos na Figura 27, com deslocamento para tempos maiores, indicando que nem o aumento do tempo de corrida ou do comprimento do capilar viabilizaram a separação do TBHQ.

Considerando que o sinal do TBHQ poderia estar saindo junto do sinal dos ésteres do biodiesel, foi feita uma tentativa de separação empregando uma ciclodextrina, com as condições experimentais originais. A ciclodextrina foi utilizada devido à possibilidade de encapsular o TBHQ na sua cavidade hidrofóbica, sendo os eletroferogramas obtidos apresentados na Figura 29.

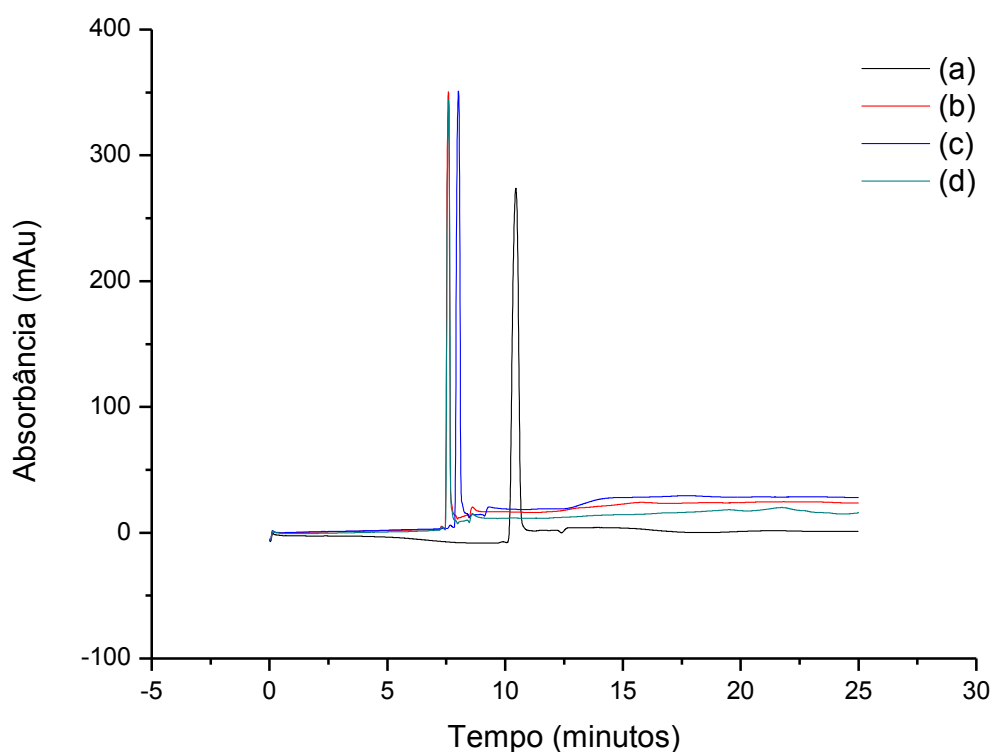


**Figura 29.** Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel: (a) Branco; (b) Ácido salicílico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Ácido salicílico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e TBHQ nas concentrações: (c)  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d)  $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Todas as microemulsões contendo ciclodextrina à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de  $-30 \text{ kV}$ ; corrente de  $300 \text{ } \mu\text{A}$ ; potência de  $6 \text{ W}$ ; temperatura do cassete de  $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ ; capilar de  $50 \text{ } \mu\text{m}$  (i.d.) e  $48,5 \text{ cm}$  (e.l.  $40 \text{ cm}$ ).

Analisando a Figura 29, pode-se observar que não há o aparecimento de um terceiro pico, indicando que não houve separação do TBHQ empregando a ciclodextrina. No entanto, o pico correspondente ao ácido salicílico (entre 7,5 e 8,5 minutos) apresentou uma queda

brusca de absorvância (se comparado à Figura 27), aproximadamente de 600 para 30 mAu, sugerindo que, possivelmente, houve algum tipo de interação entre esse padrão e a ciclodextrina adicionada às microemulsões. Pode-se, ainda, observar nos eletroferogramas (c) e (d) um aumento linear dos picos relativos ao ácido salicílico com o aumento do teor de TBHQ, sugerindo que esse poderia estar saindo junto do padrão. De fato, se essa hipótese é válida, uma vez que a cavidade hidrofóbica da ciclodextrina aprisionaria o TBHQ, enquanto que seu exterior interagiria com o padrão, fazendo com que ambos os sinais saíssem no mesmo tempo, o que inviabiliza o uso da ciclodextrina como agente de separação.

Uma nova abordagem foi feita na tentativa de separar o TBHQ, dessa vez com o aumento da temperatura para 60 °C. O tempo de análise também foi aumentado (de 20 para 25 minutos), e as medidas foram feitas na ausência do padrão interno ácido salicílico. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 30 abaixo.

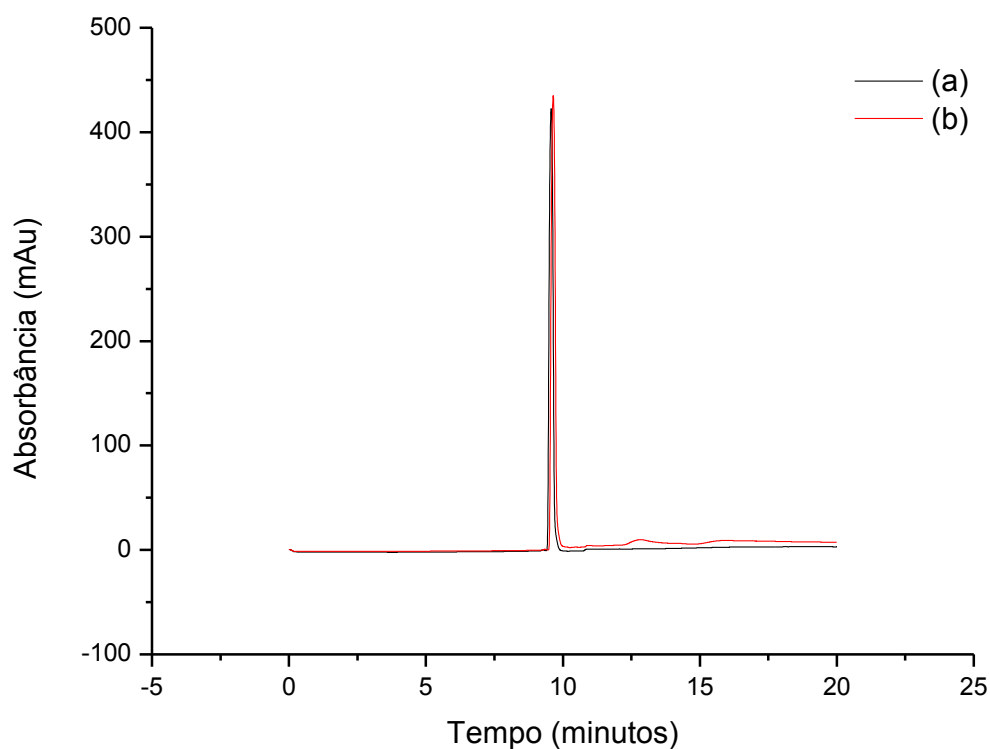


**Figura 30.** Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel: (a) Branco; TBHQ à: (b)  $6,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c)  $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (d)  $1,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de -30 kV; corrente de 300  $\mu\text{A}$ ; potência de 6 W; temperatura do cassete de 60 °C; capilar de 50  $\mu\text{m}$  (i.d.) e 48,5 cm (e.l. 40 cm).



Pode-se observar que, com o aumento das concentrações do TBHQ, a intensidade dos picos correspondentes aos ésteres do biodiesel também aumentou, indicando que a variação da temperatura não influenciou na separação do antioxidante. No entanto, comparando os eletroferogramas da Figura 30 com os eletroferogramas da Figura 27, o pico que antes aparecia em 12 minutos teve seu tempo de migração diminuído para cerca de 7 minutos, devido à diminuição da viscosidade da microemulsão decorrente do aumento da temperatura do cassete<sup>44</sup>.

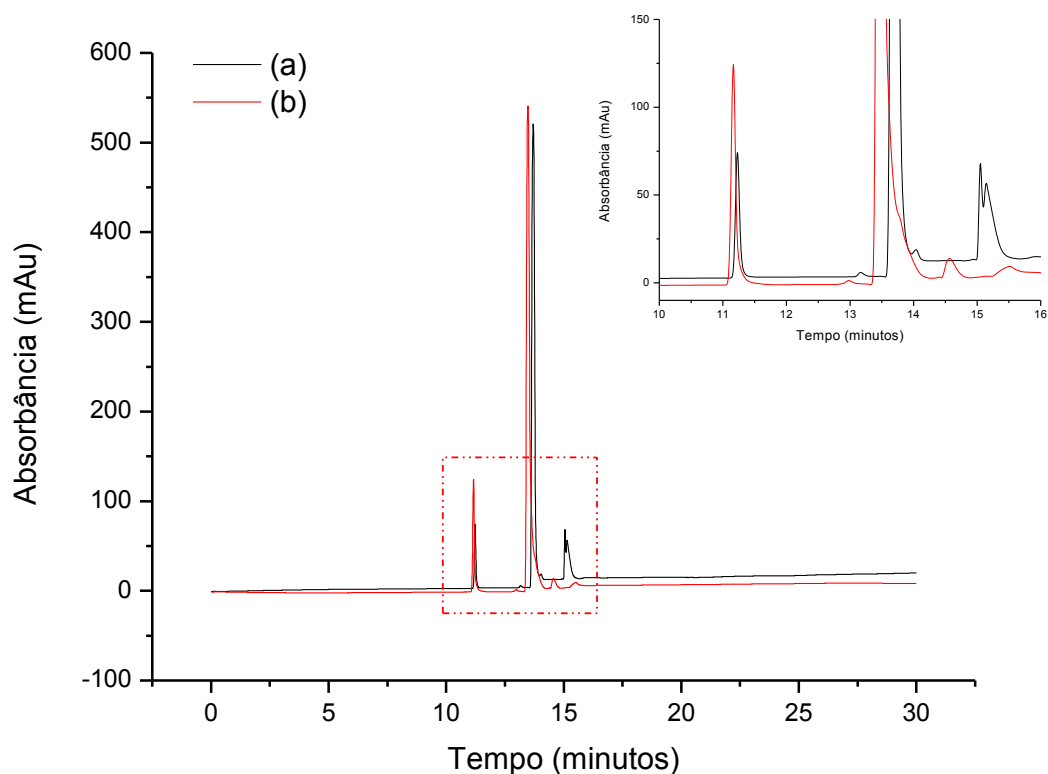
Na tentativa de separar o TBHQ, variou-se ainda a voltagem aplicada na análise. Ao invés de -30 kV, empregou-se -20 kV, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 31 a seguir.



**Figura 31.** Eletroferogramas das microemulsões de biodiesel na ausência de padrão interno: (a) Branco; (b) TBHQ à  $1,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de -20 kV; corrente de 300  $\mu\text{A}$ ; potência de 6 W; temperatura do cassete de 25 °C; capilar de 50  $\mu\text{m}$  (i.d.) e 48,5 cm (e.l. 40 cm).

Pode-se observar que não houve separação dos picos, indicando que a mudança na voltagem não influenciou nem na separação nem no tempo de migração.

Para que se pudesse ter uma repetibilidade melhor dos resultados e, conseqüentemente, uma maior confiabilidade nos mesmos, um segundo padrão interno foi adicionado: o ácido ftálico. Esse soluto já foi utilizado em estudos prévios feitos no laboratório<sup>44</sup> e mostrou ter o maior tempo de migração entre os compostos investigados, enquanto o ácido salicílico apresentou o menor tempo de migração. O ácido ftálico foi adicionado juntamente com o ácido salicílico em uma microemulsão contendo biodiesel, sendo ambos adicionados em duas concentrações,  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e  $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 32).

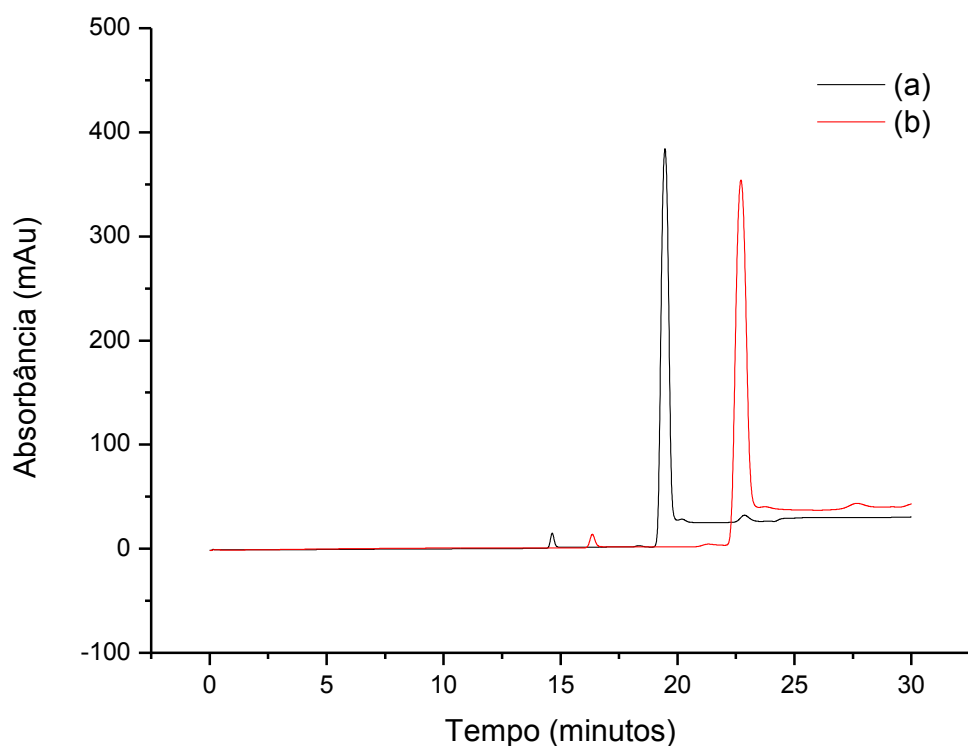


**Figura 32.** Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel: (a) Ácido salicílico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e ácido ftálico à  $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (b) Ácido salicílico à  $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e ácido ftálico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de  $-30 \text{ kV}$ ; corrente de  $300 \mu\text{A}$ ; potência de  $6 \text{ W}$ ; temperatura do cassete de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; capilar de  $50 \mu\text{m}$  (i.d.) e  $48,5 \text{ cm}$  (e.l.  $40 \text{ cm}$ ).

Observa-se que o tempo de retenção para o ácido ftálico, cujo ânion apresenta dupla carga negativa, é maior do que para o ácido salicílico, cujo ânion é monovalente. A alta mobilidade dos ânions monocarregados em microemulsão com PCP é explicada como devida à sua partição entre o meio contínuo e as gotículas, sendo os de dupla carga retidos dentro das mesmas por um tempo mais longo. Além disso, a estrutura do salicilato possibilita uma ponte de hidrogênio intramolecular, o que impede a solvatação pela PCP, fazendo-o migrar mais rápido que o ftalato, cuja estrutura não viabiliza uma ponte de hidrogênio, facilitando a solvatação do mesmo e o retardo de sua migração.

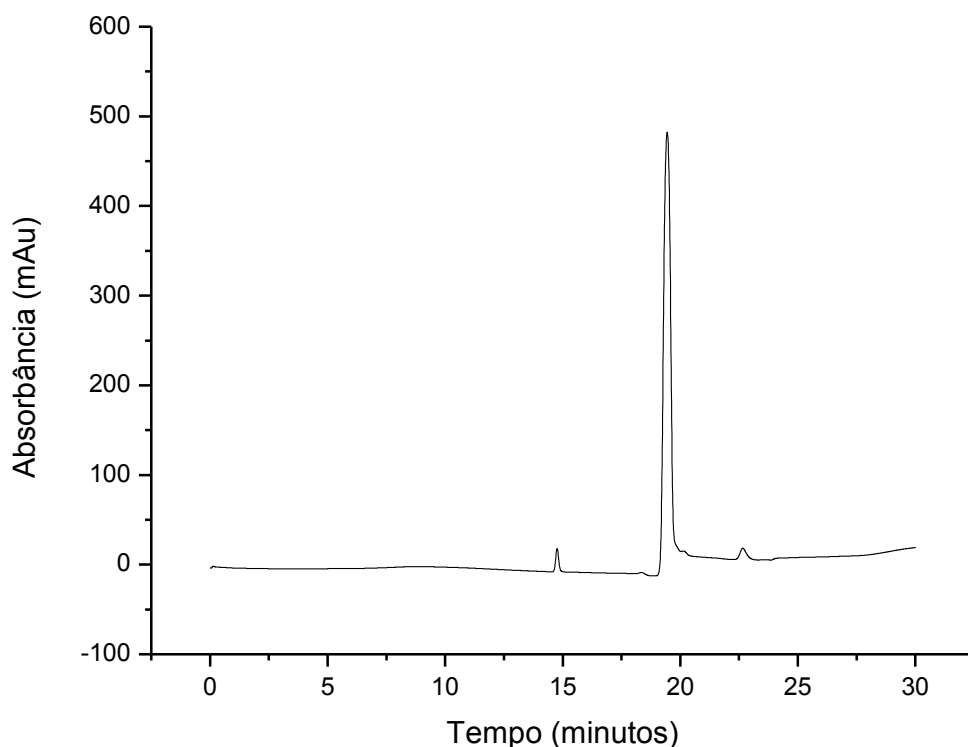
A partir dos resultados mostrados acima, pode-se confirmar que os picos em torno de 11 e em torno de 15 minutos, em ambos os eletroferogramas, correspondem, respectivamente, aos ácidos salicílico e ftálico, devido às diferentes concentrações empregadas. Já o pico de em torno de 14 minutos é atribuído aos ésteres do biodiesel.

Foi feita uma tentativa de separação com dois outros antioxidantes, BHA e BHT, adicionados à microemulsão contendo biodiesel (Figura 33). Pode-se observar a presença dos picos dos dois padrões, sendo que o ácido salicílico é visto em torno de 14,5 e 16 minutos e o ácido ftálico em torno de 23 e 27,5 minutos. Em ambos os eletroferogramas nota-se a presença de um único pico pronunciado em torno de 19 e 22,5 minutos, atribuído aos ésteres do biodiesel. Novamente, não houve a separação de picos, mesmo com o emprego de diferentes antioxidantes.



**Figura 33.** Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel contendo ácido salicílico e ácido ftálico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  cada: (a) BHA à  $2,77 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (b) BHT à  $2,27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de  $-30 \text{ kV}$ ; corrente de  $300 \mu\text{A}$ ; potência de  $6 \text{ W}$ ; temperatura do cassete de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; capilar de  $50 \mu\text{m}$  (i.d.) e  $48,5 \text{ cm}$  (e.l.  $40 \text{ cm}$ ).

Seguindo os mesmos parâmetros acima, foi feita uma análise com ambos os padrões e a adição de quatro antioxidantes (BHA, BHT, PG e TBHQ), mostrada na Figura 34.

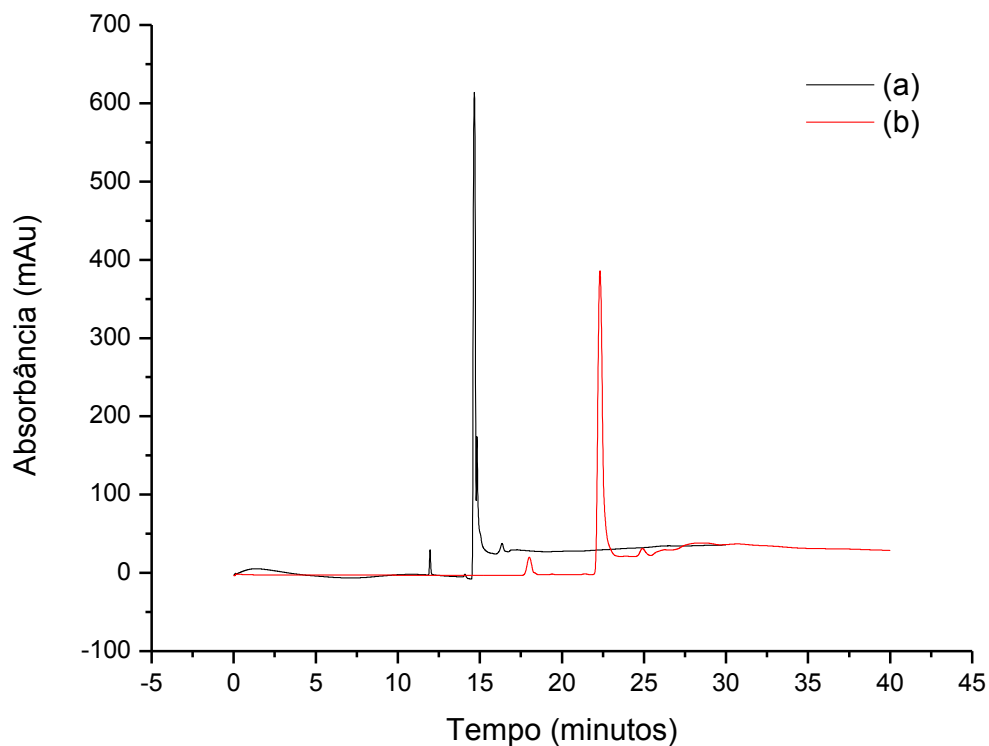


**Figura 34.** Eletroferograma da microemulsão de biodiesel com ácido salicílico e ácido ftálico à  $1,00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> cada, contendo BHA, BHT, PG e TBHQ à  $2,77 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>,  $2,27 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>,  $2,35 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e  $3,00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de -30 kV; corrente de 300  $\mu$ A; potência de 6 W; temperatura do cassete de 25 °C; capilar de 50  $\mu$ m (i.d.) e 48,5 cm (e.l. 40 cm).

Pode-se observar que não houve separação de nenhum dos antioxidantes, sendo possível a visualização apenas dos picos dos ácidos salicílico (15 minutos) e ftálico (22,5 minutos) e dos ésteres do biodiesel (19 minutos).

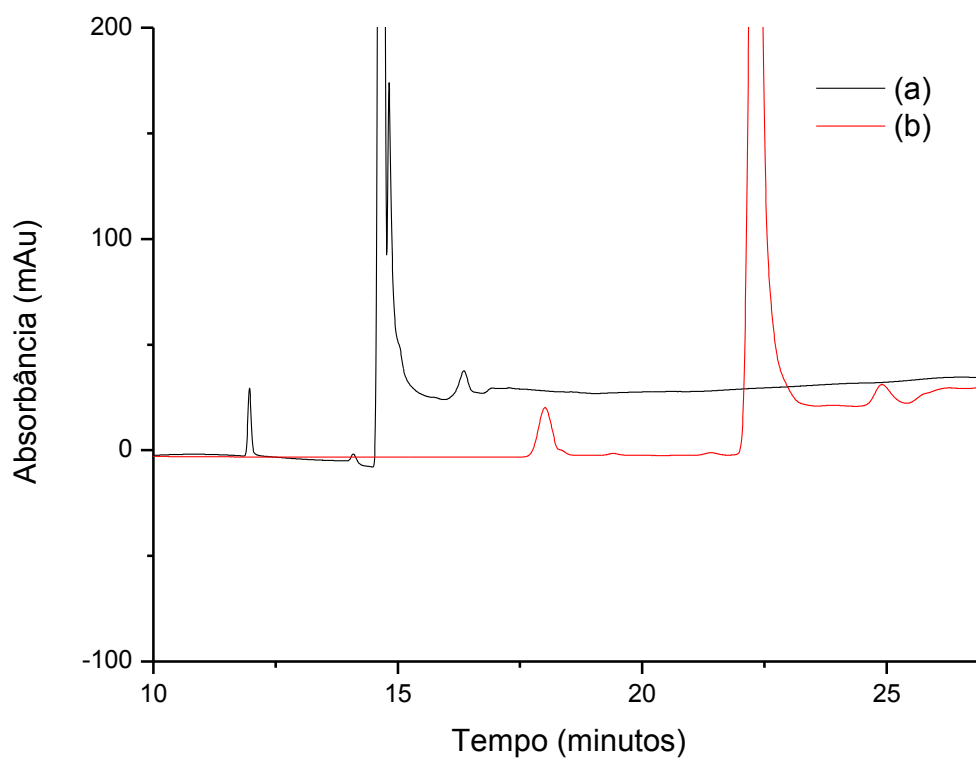
Outra abordagem para se obter a separação dos antioxidantes foi testada. Visto que não foi possível a sua separação na forma neutra, e, considerando que os mesmos estão na fase contínua da microemulsão, uma possibilidade de separação seria a obtenção dos ânions correspondentes através de uma reação ácido-base. Para isso, foi adicionada trietilamina (TEA) à microemulsão, cujo  $pK_b$  em água é de 2,99; essa base foi adicionada em uma concentração de 5% em relação à concentração do antioxidante.

Inicialmente, foram analisadas duas microemulsões, uma contendo PG à  $2,35 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e outra contendo TBHQ à  $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Os eletroferogramas obtidos são mostrados na Figura 35.



**Figura 35.** Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel contendo ácidos salicílico e ftálico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  cada e TEA: (a) PG à  $2,35 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (b) TBHQ à  $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de  $-30 \text{ kV}$ ; corrente de  $300 \mu\text{A}$ ; potência de  $6 \text{ W}$ ; temperatura do cassete de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; capilar de  $50 \mu\text{m}$  (i.d.) e  $48,5 \text{ cm}$  (e.l.  $40 \text{ cm}$ ).

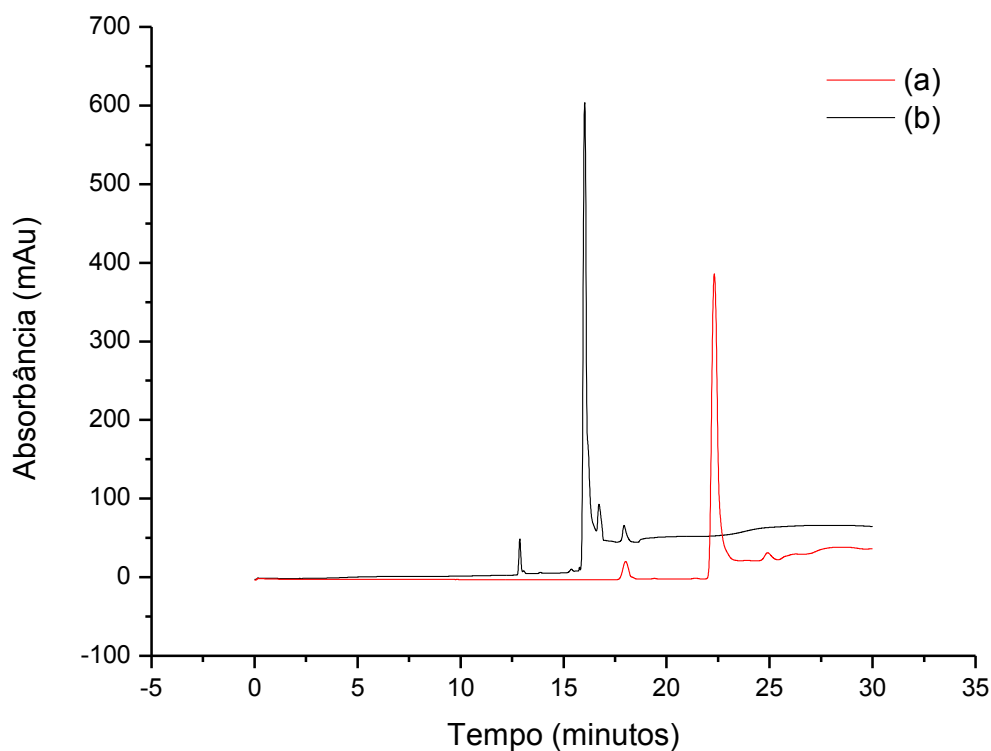
Ampliando a Figura 35, temos:



**Figura 36.** Ampliação da Figura 35.

Pode-se observar que não há separação de picos no eletroferograma (b), que corresponde ao antioxidante TBHQ; no entanto, nota-se que o pico em torno de 15 minutos no eletroferograma (a) apresenta um certo grau de separação, indicando que o PG foi identificado.

Para confirmar a separação do PG, foi feita uma nova análise de duas microemulsões contendo a amina, na ausência e presença do antioxidante. Os resultados são mostrados na Figura 37.



**Figura 37.** Eletroferogramas de microemulsões de biodiesel contendo ácido salicílico e ácido ftálico à  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  cada e TEA à 5%: (a) Ausência de PG; (b) PG à  $2,35 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Detecção UV a 290 nm (largura de banda 10 nm) com referência de 450 nm (largura de banda 40 nm); voltagem de -30 kV; corrente de 300  $\mu\text{A}$ ; potência de 6 W; temperatura do cassete de 25 °C; capilar de 50  $\mu\text{m}$  (i.d.) e 48,5 cm (e.l. 40 cm).

Pode-se observar uma nítida separação de picos em torno de 17 minutos no eletroferograma (b), indicando que o PG foi identificado. O eletroferograma (a) corresponde à microemulsão sem antioxidante, somente com a amina. Comparando o pico em torno de 22,5 minutos do eletroferograma (a) com o pico acentuado em torno de 17 minutos (cuja absorbância se encontra em cerca de 600 mAu) do eletroferograma (b), pode-se notar que a presença da amina fez com que esse pico mostrasse uma maior intensidade quando junto do antioxidante; tal pico diz respeito ao próprio biodiesel, e esse fato pode sugerir que o PG não foi totalmente separado dessa matriz, devido à grande intensidade observada no pico em 17 minutos.

Com base nessa separação do PG, utilizou-se a Equação [6]<sup>44</sup> para calcular o tempo de migração relativo ( $t_R'$ ) do antioxidante:

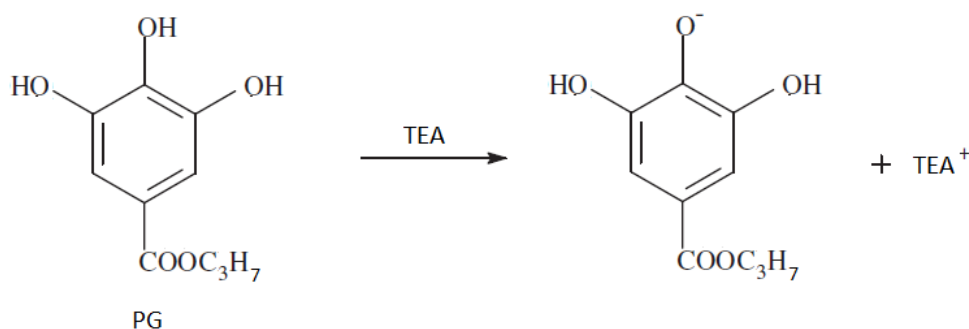


$$t_R' = (t_{II} - t_R) / (t_{II} - t_I) \quad [6]$$

onde  $t_R$ ,  $t_I$  e  $t_{II}$  são os tempos de migração do soluto, do salicilato e do ftalato, respectivamente, sendo eles 16,8, 12,75 e 18 minutos. Desse modo, tem-se que o tempo de migração relativo do PG é 0,23.

Analisando a proporção de TEA adicionada à microemulsão em relação à quantidade de PG (5% da amina em relação à concentração do antioxidante), o que se conclui é que essa quantidade de amina foi insuficiente para que a reação com o antioxidante acontecesse de forma completa.

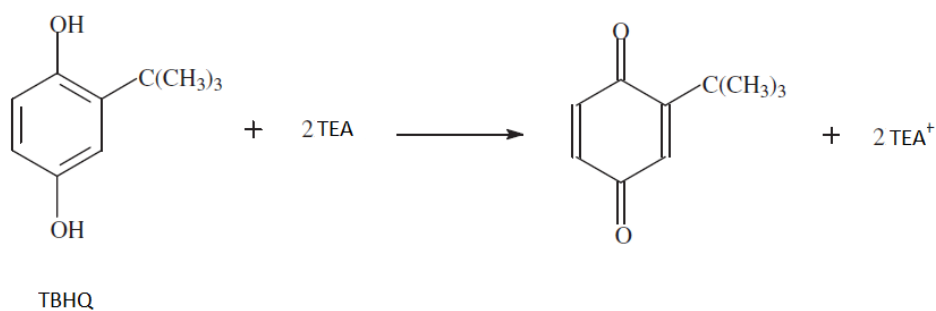
Foi observado na Figura 34 a impossibilidade de separar os quatro antioxidantes; no entanto, quando se adicionou a amina à microemulsão contendo somente PG, a separação do mesmo foi realizada. Com base na reação entre PG e água reportada na literatura<sup>87</sup>, propõe-se uma reação semelhante do PG com TEA, resultando em uma estrutura carregada negativamente (Figura 38), capaz de sofrer partição entre a gotícula (positivamente carregada) e a fase contínua da microemulsão, possibilitando sua identificação.



**Figura 38.** Mecanismo proposto de reação ácido-base entre o PG e a TEA (adaptado)<sup>87</sup>.

Essa reação gera um ânion fenólico, o qual é atraído pelo ânodo, onde está o detector (ver item 4.2.2).

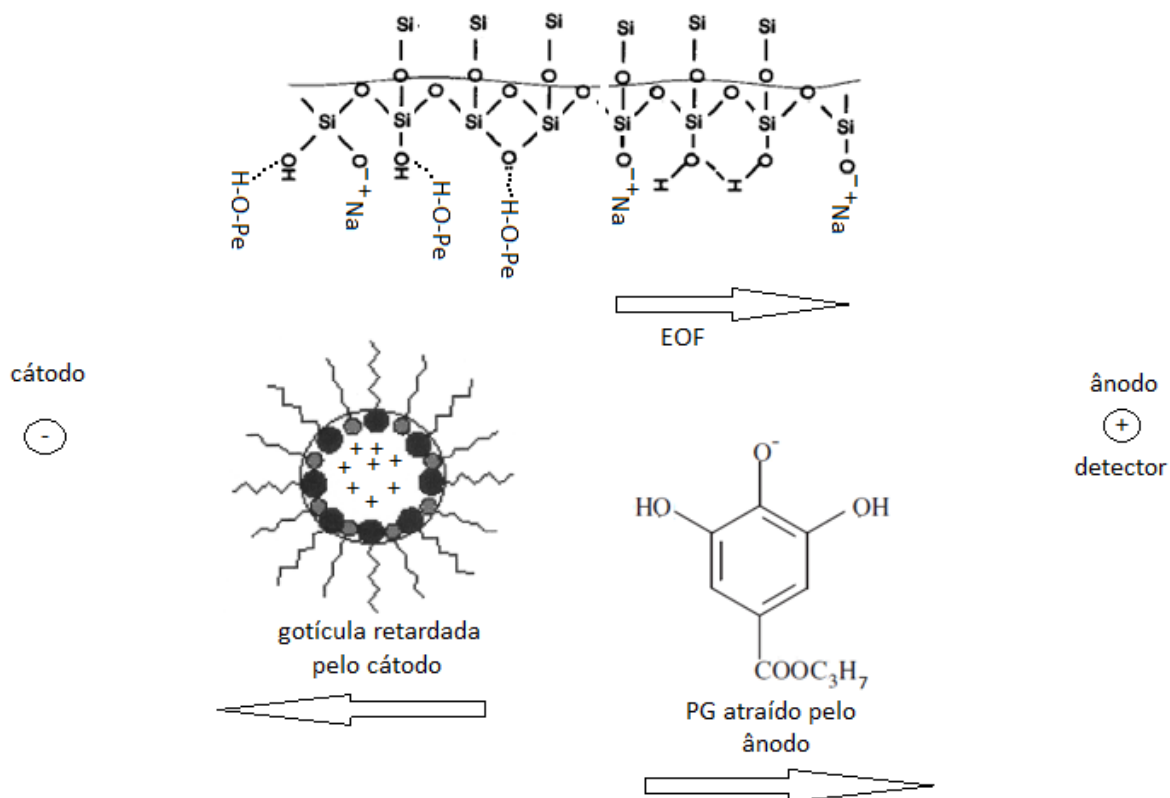
Com base no mecanismo apresentado na Figura 38, pode-se compreender a razão pela qual o TBHQ não foi identificado (Figura 39).



**Figura 39.** Mecanismo proposto de reação ácido-base entre o TBHQ e a TEA (adaptado)<sup>87</sup>.

Analisando a reação mostrada na Figura 39, observa-se que a reação do TBHQ com a amina gera uma quinona neutra, a qual está na fase contínua da microemulsão. Por outro lado, a reação da TEA com PG leva à formação de um ânion fenólico monovalente, o qual, como evidenciado no eletroferograma da Figura 37, pode ser separado dos ésteres do biodiesel. Em contrapartida, a quinona neutra resultante da reação da TEA com o TBHQ não sofre partição, estando provavelmente mascarada pelos ésteres no pico em aproximadamente 22 minutos (ver Figura 37).

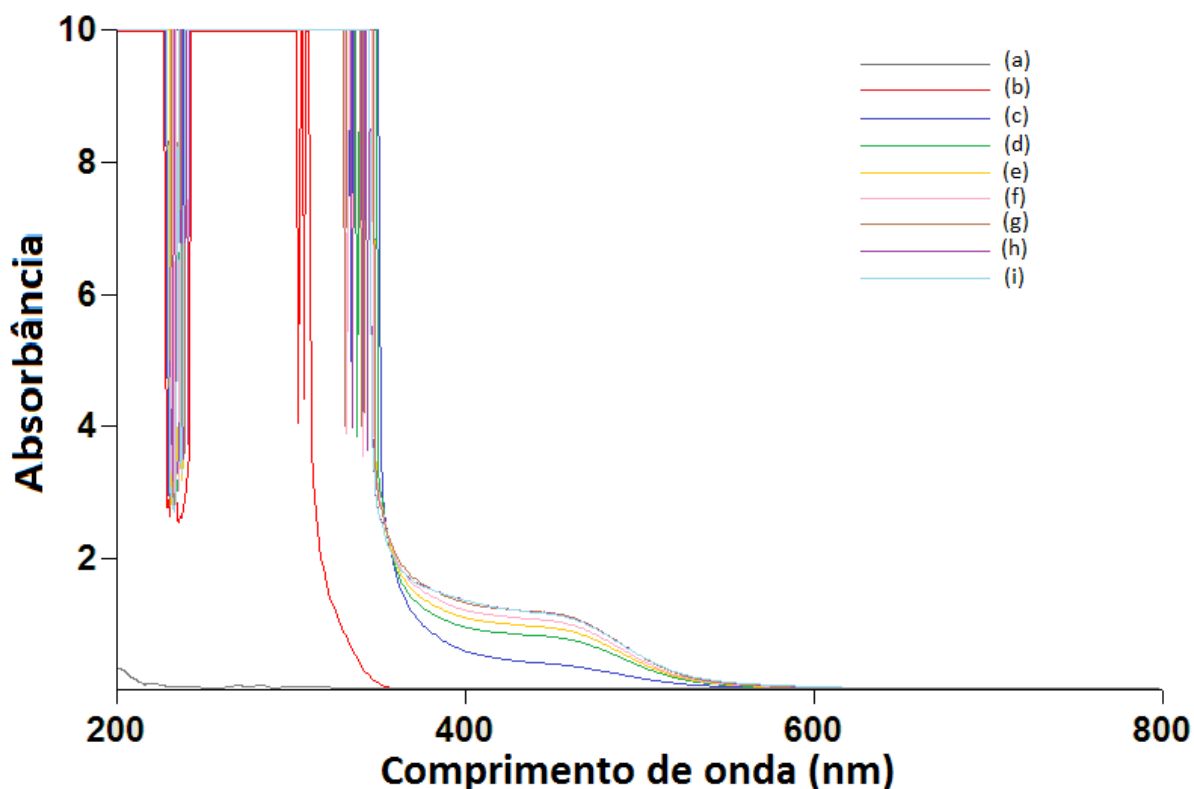
Com base nos resultados acima apresentados e na discussão no item 4.2.2, foi proposto um modelo para a superfície do capilar após contato com a microemulsão (Figura 40).



**Figura 40.** Modelo proposto para superfície do capilar após contato com a microemulsão.

#### 4.2.4. Estudos de Absorção no UV-Visível

Para melhor compreender a reação entre a TEA e o PG na microemulsão, foram obtidos os espectros de absorção no UV-Visível da microemulsão sem biodiesel, ou seja, composta por 74% de pseudo-fase e 26% de água, posteriormente aditivada com  $1,17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de PG e 5% de TEA (Figura 41).



**Figura 41.** Espectros de absorção no UV-Vis da ME sem biodiesel, composta por 74% de pseudofase e 20% de água: (a) branco; (b) PG à  $1,17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i) PG à  $1,17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e 5% de TEA, sendo os espectros obtidos no momento da adição da TEA, e em seguida em intervalos de 10 minutos cada.

Pode-se observar no espectro (b) que o antioxidante na microemulsão apresenta absorção em torno de 200 nm; já no espectro (c), após a adição de TEA, uma nova absorção em torno de 450 nm é vista, o que significa que a amina está reagindo com o antioxidante. Nos espectros subsequentes, obtidos em intervalos de 10 minutos cada, nota-se um aumento gradual no patamar entre 400 e 500 nm, indicando que a reação entre a amina e o PG apresenta controle cinético; após um período de 40 minutos, a reação se torna mais lenta, aparentemente cessando após 50 minutos.

Esperar-se-ia uma diminuição no patamar correspondente ao PG, uma vez que ele reage com a amina; no entanto, sua intensidade continua elevada, mesmo após o término da reação. Isso confirma que o teor de TEA adicionado à microemulsão contendo o PG foi insuficiente para a conversão completa do PG ao ânion correspondente; desse modo, apenas uma parte dele pôde ser identificada e quantificada.

## 5. CONCLUSÕES

As medidas voltamétricas, realizadas em microemulsão de água, SDS e *n*-pentanol contendo biodiesel, mostraram que, na voltametria potenciodinâmica, a oxidação do TBHQ aconteceu em duas etapas, nos potenciais de meia-onda 0,14 e 0,62 V vs. ferroceno, respectivamente, enquanto apenas um pico de oxidação foi observado na voltametria de pulso diferencial.

Os resultados das medidas voltamétricas empregando a técnica de adição de padrão à amostra de biodiesel em ME a/o mostraram, para ambas as técnicas eletroquímicas, uma relação linear entre o teor de antioxidante TBHQ adicionado e a corrente de oxidação. As curvas analíticas obtidas forneceram resultados da mesma ordem de grandeza para as concentrações, indicando que é possível a determinação voltamétrica de TBHQ em ME a/o de biodiesel.

Nos ensaios por MEEKC, não ocorreu a separação dos antioxidantes BHA, TBHQ e BHT nas microemulsões contendo biodiesel, provavelmente por, nas condições dos experimentos, suas mobilidades serem semelhantes às dos ésteres. Essas medidas, realizadas no modo de polaridade reversa, evidenciaram o caráter polar da fase contínua. Nela, as gotículas apresentam uma mobilidade catódica líquida e o mecanismo de partição entre as fases favorece a separação entre solutos neutros e aniônicos. Sendo assim, faz-se necessária a conversão das moléculas dos antioxidantes nos ânions correspondentes. Essa hipótese foi confirmada com a adição de TEA à ME a/o visando obter o ânion do PG, o que efetivamente ocorreu, permitindo sua separação e identificação com um tempo de retenção de 17 minutos e tempo de migração relativo de 0,23. Medidas por espectrometria de absorção molecular no UV-Vis confirmaram a reação entre PG e TEA no meio, indicando um controle cinético.

Ainda, as baixas condutividades das ME a/o contendo biodiesel evitaram o efeito *antistacking*, favorecendo seu uso na análise direta de antioxidantes por voltametria e eletroforese capilar MEEKC.

Conclui-se, portanto, a viabilidade do uso de microemulsões de água em óleo como meio solvente para a análise direta de antioxidantes em biodiesel, sem extração ou pré-concentração, empregando métodos por eletroforese capilar e voltametria.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida, E.S.; Flaysner, M.P.; Sousa, R.M.F.; Daniel, D.; Terrones, M.G.H.; Richter, E.M.; Muñoz, R.A.A.; *Fuel*, **2011**, 90, 3480.
2. Gonçalves Filho, L.C.; Micke, G.A.; *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1154, 477.
3. Lôbo, I.P.; Ferreira, S.L.C.; Cruz, R.S.; *Quím. Nova*, **2009**, 32 (6), 1596.
4. Piovezan, M.; Costa, A.C.O.; Jager, A.V.; Oliveira, M.A.L.; Micke, G.A.; *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 673, 200.
5. O BIODIESEL – Portal do Biodiesel. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br>>. Acesso em: 03/01/2012.
6. Pinto, A.C.; Guarieiro, L.L.N; Rezende, M.J.C.; Ribeiro, N.M.; Torres, E.A.; Lopes, W.A.; Pereira, P.A.P.; Andrade, J.B.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2005**, 16 (6B), 1313.
7. Tormin, T.F.; Gimenes, D.T.; Richter, E.M.; Muñoz, R.A.A.; *Talanta*, **2011**, 85, 1274.
8. Takemoto, E.; Teixeira Filho, J.; Godoy, H.T.; *Quím. Nova*, **2009**, 35 (5), 1189.
9. Ceballos, C.; Fernández, H.; *Food Res. Int.*, **2000**, 33, 357.
10. Ceballos, C.; Fernández, H.; *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **2000**, 77 (7), 731.
11. Tavares, M.F.M.; *Quím. Nova*, **1997**, 20 (5), 493.
12. Summanen, J; Vuorela, H.; Hiltunen, R.; Sirén, H.; Riekkola, M.L.; *J. Chrom. Sci.*, **1995**, 33, 704.
13. Zinellu, A.; Sotgia, S.; Usai, M.F.; Pintus, G.; Deiana, L.; Carru, C.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 399, 1815.
14. Zinellu, A.; Sotgia, S.; Deiana, L.; Carru, C.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 399, 2855.
15. Zinellu, A.; Sotgia, S.; Murtas, V.; Cossu-Rocca, P.; Miglio, M.R.; Muroli, M.R.; Mura, A.; Uras, M.G.; Contini, M.; Deiana, L.; Carru, C.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 399, 1181.
16. Hsieh, M.M.; Lin, E.P.; Huang, S.W.; *Talanta*, **2012**, 88, 638.
17. Böckel, W.J.; Martini, E.M.A.; Samios, D.; Piatnicki, C.M.S.; *Quím. Nova*, **2005**, 28 (6), 1106.
18. Mai, T.D.; Hauser, P.C.; *The Chem. Record*, **2012**, 12, 106.

19. El-Attug, M.N.; Lutumba, B.; Hoogmartens, J.; Adams, E.; Schepdael, A.V.; *Talanta*, **2010**, 83, 400.
20. El-Attug, M.N.; Hoogmartens, J.; Adams, E.; Schepdael, A.V.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, 58, 49.
21. Elbashir, A.A.; Aboul-Enein, H.Y.; *Biomed. Chromatogr.*, **2010**, 24, 1038.
22. Hommerson, P.; Khan, A.M.; Jong, G.J.; Somsen, G.W.; *Mass Spectrom. Rev.*, **2011**, 30, 1096.
23. Huang, H.Y.; Lin, C.L.; Jiang, S.H.; Singco, B.; Cheng, Y.J.; *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 719, 96.
24. Nguyen, T.T.T.N.; Østergaard, J.; Stürup, S.; Gammelgaard, B.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 402, 2131.
25. Xiu-Qin, L.; Chao, J.; Yan-Yan, S.; Min-Li, Y.; Xiao-Gang, C.; *Food Chem.*, **2009**, 113, 692.
26. Galeano-Díaz, T.; Acedo-Valenzuela, M.I.; Silva-Rodríguez, A.; *J. Food Compos. Anal.*, **2012**, 25, 24.
27. Boso, R.L.; Bellini, M.S.; Miksík, I.; Deyl, Z.; *J. Chromatogr. A*, **1995**, 709, 11.
28. Mendonça, C.R.B.; Bica, C.I.D.; Piatnicki, C.M.S.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2003**, 14 (4), 628.
29. 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.
30. Maia, E.C.R.; Borsato, D.; Moreira, I.; Spacino, K.R.; Rodrigues, P.R.P.; Gallina, A.L.; *Fuel Proces. Technol.*, **2011**, 92, 1750.
31. BIODIESEL – ANP. Disponível em <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 23/01/2012.
32. Neto, P.R.C.; Rossi, L.F.S.; Zagonel, G.F.; Ramos, L.P.; *Quím. Nova*, **2000**, 23 (4), 531.
33. Guzatto, R. **Otimização da metodologia TDSP para produção de biodiesel e projeto de planta piloto**. *Dissertação de mestrado*. UFRGS –Porto Alegre/RS/Brasil, 2010.
34. Maia, E.C.R.; Borsato, D.; Moreira, I.; Spacino, K.R.; Rodrigues, P.R.P.; Gallina, A.L.; *Fuel Proces. Technol.*, **2011**, 92, 1750.
35. Domingos, A.K.; Saad, E.B.; Vechiatto, W.W.D.; Wilhelm, H.M.; Ramos, L.P.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2007**, 18 (2), 416.

36. Du Plessis, L.M.; De Villiers, J.B.M.; Van der Walt, W.H.; *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **1985**, 62 (4), 748.
37. Frankel, E.N.; *Progress in Lipid Research*, **1980**, 19, 1.
38. Ramalho, V.C.; Jorge, N.; *Quím. Nova*, **2006**, 29 (4), 755.
39. Ziyatdinova, G.; Gainetdinova, A.; Morozov, M.; Budnikov, H.; Grazhulene, S.; Red'Kin, A.; *J. Solid State Electrochem.*, **2012**, 16 (1), 127.
40. Temerdashev, Z.A.; Frolova, N.A.; Kolychev, I.A.; *J. Anal. Chem.*, **2011**, 66 (4), 407.
41. Ding, M.; Zou, J. *Food Chem.*, **2012**, 131 (3), 1051.
42. Yang, M.; Lin, H.; Chong, Y.; *Food Res. Int.*, **2002**, 35 (7), 627.
43. Darji, V.; Boyce, M.C.; Bennett, I.; Breadmore, M.C.; Quirino, J.; *Electrophoresis*, **2010**, 31, 2267.
44. 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.* UFRGS – Porto Alegre/RS/Brasil, 2005.
45. 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.; *Revista de Ciênc. Farmac. Bás. Aplic.*, **2011**, 32 (1), 9.
46. Ryan, R.; Donegan, S.; Power, J.; Altria, K.; *Electrophoresis*, **2010**, 31, 755.
47. Shi, Y.; Wu, Y.; Hao, J.; Li, G.; *J. Polymer Sci. Part A: Polymer Chem.*, **2005**, 43 (1), 203.
48. Zhang, G.; Zhou, H.; Zhang, J.; Han, X.; Chen, J.; Kuang, Y.; *J. Applied Polymer Sci.*, **2012**, 125 (3), 2342.
49. Holec, P.; Plocek, J.; Niznansky, D.; Vejpravová, J.P.; *J. Sol-Gel Sci. Technol*, **2009**, 51, 301.
50. Du, Y.; Wang, W.; Li, X.; Zhao, J.; Ma, J.; Liu, Y.; Lu, G.; *Materials Letters*, **2012**, 68, 168.
51. Mishra, S.; Chatterjee, A.; *Polym. Advanc. Technol.*, **2011**, 22 (12), 1593.
52. Yang, L.; Liu, L.; Xiao, D.; Zhu, J.; *Materials Letters*, **2012**, 72, 113.
53. Formariz, T.P.; Urban, M.C.C.; Silva Júnior, A.A.; Gremião, M.P.D.; Oliveira, A.G.; *Revista Bras. Ciênc. Farmac.*, **2005**, 41 (3), 301.



54. Chen, Z.; Lin, Z.; Zhang, L.; Cai, Y.; Zhang, L.; *Analyst*, **2012**, 137 (7), 1723.
55. Oliveira, A.G.; Scarpa, M.V.; Correa, M.A.; Cera, L.F.R.; Formariz, T.P.; *Quím. Nova*, **2004**, 27 (1), 131.
56. *Multiple Emulsions: Technology and Applications*. Edited by Abraham Aserin. John Wiley & Sons. Capítulo 1, p. 5, 2008.
57. Dantas, T.N.C.; Silva, A.C.; Neto, A.A.D.; *Fuel*, **2001**, 80, 75.
58. Moulik, S.P.; Paul, B.K.; *Adv. Colloid and Interface Sci.*, **1998**, 78, 99.
59. Colombara, R.; Tavares, M.F.M.; Massaro, S.; *Quím. Nova*, **1997**, 20 (5), 512.
60. St. Claire, R.L.; *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 569R.
61. Tavares, M.F.M.; *Quím. Nova*, **1996**, 19 (2), 173.
62. Weinberger, R. **Practical capillary electrophoresis**, *Academic Press*: New York, 1993.
63. Silva, C.A. **Estudos fundamentais e aplicações envolvendo hormônios esteroides por meio de eletroforese capilar**. *Tese de doutorado*. USP – São Paulo/SP/Brasil, 2007.
64. Mahuzier, P.E.; Aurora Prado, M.S.; Clark, B.J.; Kedor-Hackmann, E.R.M.; Altria, K.D.; *LC-GC Europe*, Jan 2003, 2-7.
65. Yin, C.; Cao, Y.; Ding, S.; Wang, Y.; *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1193, 172.
66. Lucangioli, S.; Sabrina, F.; Mario, C.; Valeria, T.; *Electrophoresis*, **2009**, 30, 1899.
67. Cao, Y.; Gong, W.; Li, N.; Yin, C.; Wang, Y. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 392 (5), 1003.
68. Jiang, T.F.; Lv, Z.H.; Wang, Y.H.; Yue, M.E.; Lian, S.; *Analytical Sciences*, **2009**, 25, 861.
69. Richter, E.M.; Lago, C.L.; Angnes, L.; *Quím. Nova*, **2006**, 29 (4), 862.
70. Crespi, F.; *Analytical Biochemistry*, **1991**, 194 (1), 69.
71. Wang, Y.X.; Ni, Y.N.; Kokot, S.; *Chinese Chemical Letters*, **2010**, 21, 963.
72. Streeter, I.; Wildgoose, G.G.; Shao, L.; Compton, R.G.; *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2008**, 133, 462.
73. Souza, D.; Machado, S.A.S.; Avaca, L.A.; *Quím. Nova*, **2003**, 26 (1), 81.
74. Shahrokian, S.; Ghalkhani, M.; *Electrochimica Acta*, **2010**, 55, 3621.

75. Shahrokian, S.; Ghalkhani, M.; Amini, M.K.; *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2009**, 137, 669.
76. Li, J.; Zhang, Y.; Yang, T.; Zhang, H.; Yang, Y.; Xiao, P.; *Mat. Sci. Engineer. C*, **2009**, 29, 2360.
77. Xie, X.; Stüben, D.; Berner, Z.; Albers, J.; Hintsche, R.; Jantzen, E. *Sensors and Actuators B*, **2004**, 97, 168.
78. Hernández, P.; Sánchez, I.; Patón, F.; Hernández, L.; *Talanta*, **1998**, 46, 985.
79. Matsue, T.; Koike, S.; Abe, T.; Itabashi, T; Uchida, I.; *Biochim. et Biophys. Acta*, **1992**, 1101, 69.
80. Gladysz, O.; Los, P.; *Electrochimica Acta*, **2008**, 54, 801.
81. Fleischmann, M.; Pons, S.; Rolison, D.R.; Schmidt, P.P. **Ultramicroelectrodes**. *Datatech Systems, Inc.*: Morganton, 1987.
82. Brett, C.M.A.; Brett, A.M.O. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. *Oxford University Press*: New York, 1993.
83. Alligrant, T.M.; Hackett, J.C.; Alvarez, J.C.; *Electrochimica Acta*, **2010**, 55, 6507.
84. Mackay, R.A.; *Adv. Colloid Interface Sci.*, **1981**, 15, 131.
85. Georges, J.; Berthod, A. J.; *Electroanal. Chem.*, **1984**, 175, 143.
86. Santhanalakshmi, J.; Anadhi, K. J.; *Colloid Interf. Sci.*, **1995**, 176, 226.
87. Medeiros, R.A.; Rocha-Filho, R.C.; Fatibello-Filho, O.; *Food Chemistry*, **2010**, 123, 886.