

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

Nova abordagem para a determinação do glicerol livre em biodiesel baseada na oxidação com o periodato

Luana de Oliveira Santos

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**NOVA ABORDAGEM PARA A DETERMINAÇÃO DO GLICEROL
LIVRE EM BIODIESEL BASEADA NA OXIDAÇÃO COM O
PERIODATO**

LUANA DE OLIVEIRA SANTOS

Sob a Orientação do Professor
Dr. José Geraldo Rocha Junior

e Co-orientação da Professora
Dra. Cristina Maria Barra

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica - RJ
Outubro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237n Santos, Luana de Oliveira, 1992-
Nova abordagem para a determinação do glicerol
livre em biodiesel baseada na oxidação com o
periodato. / Luana de Oliveira Santos. - Rio de
Janeiro, 2019.
64 f.: il.

Orientador: José Geraldo Rocha Jr..
Coorientadora: Cristina Maria Barra.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Química, 2019.

1. Biocombustível. 2. Molibdato. 3. Periodato. 4.
Resolução ANP 45/2014. 5. Titrimetria. I. Rocha Jr.,
José Geraldo, 1984-, orient. II. Barra, Cristina
Maria, 1955-, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em
Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LUANA DE OLIVEIRA SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química,
no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/10/2019

Prof. Dr. José Geraldo Rocha Junior – DQA/IQ/UFRRJ
(Orientador)

Prof^a. Dra. Viviane Gomes Teixeira – DQA/IQ/UFRRJ

Prof. Dr. Flávio Couto Cordeiro – DQA/IQ/UFRRJ

“Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.”

(Bíblia Sagrada, Romanos 11:36)

AGRADECIMENTOS

A meu Deus, em quem deposito minha fé e esperança, por todo o direcionamento diante o meu percurso de vida.

À minha mãe, Rita de Cássia, e meu irmão, Luan Gabriel, por todas as orações, sustento e incentivo para a realização dos meus projetos.

Ao meu pai, Jorge (“*in memoriam*”), por fazer-me herdar seus melhores sentimentos.

Ao meu tio Adilson, pela generosidade e demonstração de carinho durante toda a minha formação.

À minha tia Regina, por todo o cuidado e mimo em toda minha vida.

Às minhas tias paternas, que mesmo distantes se fizeram presentes em minha vida.

Ao meu namorado Rafael, por não medir esforços para me ver feliz, pela paciência, cuidado e carinho demonstrado em todo o tempo.

Ao meu professor José Geraldo, por sua grande generosidade, paciência, confiança e dedicação desempenhadas em minha orientação acadêmica, além de ser inspiração para minha caminhada profissional e espiritual.

Aos professores Otávio e Cristina, por todo o auxílio para o desenvolvimento do projeto e por sempre demonstrarem que possuem um grande coração.

À minha melhor amiga Carlinha, que apesar da distância, sempre estivemos conectadas, orando e cuidando uma da outra.

À minha amiga Marcelle, pela confiança à indicação ao estágio no laboratório de Analítica, onde, atualmente exerço meu projeto de mestrado.

À minha amiga Bia, pelo apoio espiritual e pelos conselhos oferecidos durante minha graduação e mestrado.

Aos meus amigos amados Mateus, Giuliano, Glauco, Gabi e Carol por todos os momentos de alegria vividos juntos dentro e fora de nossa Universidade.

A todos os meus pastores, líderes e amigos da EBD Juventude Nazarena, JNI e CJN da Primeira Igreja do Nazareno, em Nilópolis, e ao grupo UP por todas as orações, direcionamento e momentos de comunhão.

Aos meus companheiros de aula e de laboratório Érica, Sheisi, Carol, Renan, Andreza, Victor, Gabriel, Andressa, Larissa, Natália, Cayo pela amizade, conselhos, e por suas presenças terem tornado meus dias ainda mais alegres.

Aos alunos Pâmela e Lucas por toda dedicação e auxílio para o desenvolvimento do projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química, por todo o ensino e por serem essenciais para a minha formação.

Ao IQ-UNICAMP, pelo fornecimento de matéria-prima para o início do projeto.

À UFRRJ, por ter me acolhido tão bem durante os anos aqui vividos.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

RESUMO

SANTOS, Luana de Oliveira. **Nova abordagem para a determinação do glicerol livre em biodiesel baseada na oxidação com o periodato**. 2019. 64 p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica- RJ, 2019.

Os padrões de qualidade para o biodiesel comercializado no Brasil são estabelecidos pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), por meio da Resolução Brasileira nº 45 de 2014 (RANP 45/2014). A RANP 45/2014 estipula o teor máximo de 0,02% m/m de glicerol livre no biodiesel adicionado ao diesel. Maiores concentrações de glicerol podem levar a problemas nos tanques de armazenamento do combustível, formação de depósitos e entupimento no sistema de injeção do motor, além de emissão de aldeídos tóxicos. Neste trabalho, uma nova abordagem para a determinação de glicerol livre em biodieseis provenientes de óleos de soja, palmiste, macaúba (polpa) e fritura foi desenvolvida empregando a oxidação do glicerol com periodato e mascaramento do periodato excedente com molibdato. Isto diminuiu o tempo requerido para a oxidação, pelo excesso de periodato empregado. O iodato formado na oxidação do glicerol foi quantificado a partir do ânion tri-iodeto produzido após adição de iodeto. A determinação iodométrica foi realizada empregando as técnicas espectrofotométrica e titrimétrica, em três dias de análise. O método espectrofotométrico foi baseado na extração do glicerol por partição em etanol-água/n-heptano, e determinação do tri-iodeto na presença de amido, em $\lambda = 582$ nm. Duas curvas analíticas foram construídas a partir da leitura de padrões de glicerol em espectrofotômetro de feixe duplo e único. Este último gerou medidas de maior precisão e curva analítica com baixos limites de detecção ($1,9 \text{ mg L}^{-1}$) e quantificação ($5,7 \text{ mg L}^{-1}$), e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9972. Na análise dos biodieseis, a repetibilidade do método foi satisfatória ($CV < 12\%$), ao contrário da precisão intermediária ($CV < 39\%$), segundo a ANOVA dos teores de glicerol livre obtidos entre os dias. O método titrimétrico foi aplicado na análise de padrões aquosos de glicerol, a partir da titulação do tri-iodeto com solução padrão de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, na presença de amido, e apresentou excelente exatidão, com erros relativos inferiores a $\pm 3,0\%$. Limites de detecção e quantificação de $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,5 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, foram encontrados a partir de uma curva de resposta. Para a análise titrimétrica dos biodieseis, foi realizada anteriormente, a extração do glicerol livre por partição em água/n-heptano. A precisão deste método foi boa em nível de repetibilidade ($CV < 14\%$) e em termos de precisão intermediária ($CV < 8\%$), avaliada pela ANOVA. A exatidão do método titrimétrico foi avaliada frente a testes de recuperação em 3 níveis de fortificação: 250, 500 e 1000 mg L^{-1} e alcançou entre 91% e 105% de recuperação. Os teores médios globais de glicerol livre nos biodieseis obtidos pelos dois métodos não diferiram significativamente ao nível de confiança de 95%, segundo teste *t de Student*. No entanto, o método titrimétrico apresentou menores variações entre os dias, menor custo e maior simplicidade em comparação ao método espectrofotométrico. Além disso, permite quantificar o glicerol no biodiesel em um curto tempo (cerca de 10 minutos), quando comparado às demais técnicas de análise descritas na literatura, e apresenta um menor limite de detecção, em comparação a outros métodos titrimétricos.

Palavras-chave: biocombustível. molibdato. periodato. Resolução ANP 45/2014. titrimetria.

ABSTRACT

SANTOS, Luana de Oliveira. **New approach to the determination of free glycerol in biodiesel based on oxidation with periodate.** 2019. 64 p. Dissertation (Master in Chemistry). Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The quality standards for biodiesel commercialized in Brazil are set by the National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuel (ANP), through Brazilian Resolution N°. 45 of 2014 (RANP 45/2014). RANP 45/2014 sets the maximum free glycerol content in biodiesel added to diesel oil at 0.02% w/w. The higher free glycerol content could lead to troubles in fuel storage tanks, formation of deposits and clogging in the engine injection system and emission of toxic aldehydes. In this work, a new approach to determine free glycerol in biodiesel from soybean, palmist, macauba (pulp) and used frying oils was developed employing the glycerol oxidation by the periodate and, after, masking of the excess periodate by the molybdate. This provided a decrease in the oxidation time probably due to excess periodate employed. The iodate formed in oxidation of glycerol was quantified by the addition of iodide, forming the tri-iodide anion. The iodometric determination was performed in three days with spectrophotometric and titrimetric techniques. In the spectrophotometric method, the glycerol was extracted by partition in ethanol-water/n-heptane and the tri-iodide was determined in the presence of starch ($\lambda = 582$ nm). Two analytical curves were constructed after analysis of glycerol standards in a dual and single beam spectrophotometer. The latter had lower precision in the measurements, and its analytical curve presented low limits of detection (1.9 mg L^{-1}) and quantification (5.7 mg L^{-1}), and good coefficient of determination ($R^2 = 0.9972$). The repeatability of spectrophotometric method was satisfactory ($CV < 12\%$), however the intermediate precision was unfavorable ($CV < 39\%$), according to ANOVA free glycerol contents obtained between the days. The analysis of glycerol standards in water by titrimetric method was done by the titration of tri-iodide with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ standard solution, in the presence of starch, and presented excellent accuracy, with relative errors below 3.0%. Detection and quantification limits were 1.2 mg L^{-1} and 3.5 mg L^{-1} , respectively. Biodiesels were analyzed by titrimetric method after glycerol extraction by partition in water/n-heptane. The precision of this method was good in repeatability ($CV < 14\%$) and intermediate precision ($CV < 8\%$), evaluated by ANOVA. The accuracy of the titrimetric method was evaluated by recovery tests at three fortification levels: 250, 500 and 1000 mg L^{-1} , reaching 91% to 105% of recovery. The average global levels of free glycerol levels in the biodiesels obtained by both methods did not differ significantly at the 95% confidence level, according to the Student's t-test. However, the titrimetric method presented smaller variations between days, lower cost and greater simplicity compared to the spectrophotometric method. In addition, the analyses were quick (10 min) when compared to the other techniques described in the literature and lower detection limit compared to other titrimetric methods.

Keywords: biofuel. molybdate. periodate. ANP Resolution 45/2014. titrimetry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações do Biodiesel e Métodos de Análise	18
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do glicerol, a 20 °C.....	19
Tabela 3. Composição percentual de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) no biodiesel de soja, palmiste e macaúba (polpa).....	38
Tabela 4. Valor da integral dos sinais de RMN ¹ H dos biodieseis e porcentagem de conversão dos triglicerídeos à metil ésteres.....	41
Tabela 5. Parâmetros da curva analítica do método espectrofotométrico em equipamento de feixe único	45
Tabela 6. Teor médio diário e global (\pm desvio padrão), em g 100g ⁻¹ , de glicerol livre nos biodieseis e coeficiente de variação (CV)	47
Tabela 7. Tabela ANOVA dos teores de glicerol livre obtidos em três dias de análise, para os diferentes biodieseis	48
Tabela 8. Condições reacionais para a determinação do glicerol por espectrofotometria e titrimetria.....	48
Tabela 9. Concentração nominal, real e média dos padrões de glicerol (em mg L ⁻¹), volume médio de titulante (em mL) e os respectivos desvios padrões.....	50
Tabela 10. Erro relativo percentual e valores de <i>t</i> calculados para a comparação entre as concentrações de glicerol (<i>C</i>) obtidas pelo método titrimétrico e os valores dos padrões (<i>C_{real}</i>)	51
Tabela 11. Parâmetros da curva de resposta do método titrimétrico	51
Tabela 12. Teores médios diário e global (\pm desvio padrão), em g 100g ⁻¹ , de glicerol livre nos biodieseis e seus respectivos coeficientes de variação (CV).....	53
Tabela 13. Tabela ANOVA dos teores de glicerol livre obtidos em três dias de análise, para os diferentes biodieseis	53
Tabela 14. Porcentagem de recuperação \pm desvio padrão (%Rec \pm <i>s</i>) do glicerol adicionado ao biodiesel.....	54
Tabela 15. Teor médio global (\pm desvio padrão), em g 100g ⁻¹ , de glicerol livre nos biodieseis e parâmetros estatísticos para comparação entre os métodos estudados	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação Malaprade: oxidação do glicerol pelo íon periodato formando o aldeído fórmico, ácido fórmico, iodato e água	15
Figura 2. Reação de Hantzsch: ciclização da acetilacetona com aldeído fórmico, em meio amoniacal, formando a 3,5-diacetil-1,4-di-hidrolutidina e água	15
Figura 3. Reação de mascaramento do periodato pelo íon molibdato	15
Figura 4. Reação genérica de transesterificação de um triglicerídeo com um álcool, na presença de um catalisador, formando glicerol e ésteres monoalquílicos	16
Figura 5. Mecanismo geral da reação de esterificação de um ácido graxo com um álcool em meio ácido, formando éster e água (CAVALCANTE, et al., 2015)	17
Figura 6. Fórmula estrutural do glicerol	19
Figura 7. Mecanismo da Reação de Malaprade do glicerol com ácido periódico (NOGUEIRA, 2011)	23
Figura 8. Separação das fases do glicerol (mais densa) e do biodiesel (menos densa) após transesterificação do óleo de soja	37
Figura 9. Espectros de RMN ¹ H do óleo de soja (A) e do biodiesel metílico de soja (B)	39
Figura 10. Espectros de RMN ¹ H dos biodieseis metílicos de soja (A), palmiste (B), macaúba (C) e fritura (D)	40
Figura 11. Efeito da adição do molibdato em mistura de iodato e periodato: (a) experimento com molibdato e (b) sem molibdato	42
Figura 12. Espectro de absorvância de misturas contendo os padrões de iodato de concentração 0,200 a 1,40 mmol L ⁻¹	43
Figura 13. Curva analítica para a determinação do glicerol, obtida no espectrofotômetro de feixe duplo	44
Figura 14. Curva analítica para a determinação do glicerol, obtida no espectrofotômetro de feixe único	44
Figura 15. Gráfico de resíduos da regressão linear calculados com os pontos experimentais obtidos pelo método espectrofotométrico	45
Figura 16. Curva de resposta dos padrões de glicerol obtida por método titrimétrico	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGLs	ácidos graxos livres
ANOVA	análise de variância
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Químicos Agrícolas Oficiais
AOCS	Sociedade Americana dos Químicos de Óleo
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais
BSTFA	N,O-Bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida
CEN	Comitê Europeu de Normalização
GC-FID	cromatografia gasosa com detector de ionização em chama
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
CV	coeficiente de variação
DMF	di-metilformamida
DP	desvio padrão
FB	fluxo contínuo
FIA	análise de injeção em fluxo
gl	grau de liberdade
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-MS	cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa
HPLC-PAD	cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por pulso amperométrico
HPLC-RID	cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por refratometria
HPLC-UV	cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	Organização Internacional de Normalização

LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MS	Espectrometria de massas
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
NC	nível de confiança
PROBIODIESEL	Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel
RANP	Resolução da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
UV-Vis	Ultra-violeta e visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 BODIESEL.....	16
2.2 GLICEROL	19
2.3 MÉTODOS OFICIAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE GLICEROL LIVRE EM BODIESEL	20
2.4 MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA A DETERMINAÇÃO DE GLICEROL LIVRE EM BODIESEL	21
2.5 MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DO GLICEROL ENVOLVENDO A OXIDAÇÃO COM O PERIODATO.....	23
2.6 MÉTODOS IODOMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE GLICEROL LIVRE	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 REAGENTES	30
4.2 INSTRUMENTAÇÃO	30
4.3 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BODIESEL.....	30
4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	31
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GLICEROL LIVRE POR ESPECTROFOTOMETRIA	33
4.5.1 Preparo das soluções analíticas	33
4.5.2 Avaliação da proporção dos reagentes empregados na análise	33
4.5.3 Construção da curva analítica.....	33
4.5.4 Determinação do teor de glicerol livre nos biodieseis.....	34
4.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GLICEROL LIVRE POR TITRIMETRIA.....	35
4.6.1 Preparo das soluções analíticas	35
4.6.2 Padronização de solução de tiosulfato de sódio 0,005 mol L ⁻¹	35
4.6.3 Determinação do glicerol em padrões aquosos	35
4.6.4 Determinação do teor de glicerol livre nos biodieseis.....	35
4.6.5 Ensaio de recuperação do glicerol livre em biodiesel	36
4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BODIESEL.....	37
5.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GLICEROL LIVRE POR ESPECTROFOTOMETRIA	41
5.2.1 Avaliação da proporção dos reagentes empregados na análise	41
5.2.2 Construção da curva analítica.....	43
5.2.3 Determinação do teor de glicerol livre nos biodieseis.....	46
5.3 DETERMINAÇÃO TITRIMÉTRICA DO GLICEROL LIVRE	48
5.3.1 Determinação de glicerol livre em padrões aquosos	49
5.3.2 Determinação de glicerol livre nos biodieseis.....	52
5.4 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICO E TITRIMÉTRICO.....	55
CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

O Brasil vem integrando o biodiesel na matriz energética nacional através do Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel (PROBIODIESEL). Este Programa tem a finalidade de substituir gradualmente o diesel derivado do petróleo pelo biodiesel, em motores de ignição por compressão, por apresentar vantagens como alto número de cetano, teor médio de oxigênio em torno de 10% em volume (o que favorece a combustão completa), maior ponto de fulgor, menor emissão de partículas, hidrocarbonetos, monóxido e dióxido de carbono (PROKOPOWICZ, 2015).

O Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) estabeleceu o percentual em volume de biodiesel utilizado nos motores a diesel em 11% v/v, a partir de junho de 2019 ou em até 3 meses após a conclusão dos ensaios em motores e deverá alcançar até 15% v/v em 2023 (CNPE, 2018).

A reação de transesterificação é a principal via de síntese de biodiesel e gera cerca de 10% em volume de um líquido viscoso e incolor, denominado glicerol (1,2,3-propanotriol), popularmente conhecido, em sua forma bruta, como glicerina (MOTA, 2011). Segundo a Resolução Brasileira nº 45, de 2014, (RANP 45/2014) da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o limite máximo permitido de glicerol livre no biodiesel é de 0,02% m/m. Valores superiores podem facilitar a sua separação do biocombustível no sistema veicular, podendo levar à corrosão do sistema de injeção do motor e ao aumento do consumo de combustível. Além disso, o glicerol afeta o desempenho do motor e a sua desidratação pode levar à emissão de acroleína, um aldeído tóxico à saúde e ao meio ambiente, caso a queima do combustível ultrapasse a temperatura de 180 °C (CHEN, 2015).

A determinação de glicerol livre no biodiesel tem grande importância, pois envolve a avaliação da qualidade do produto e da eficiência de purificação do biocombustível. Segundo a RANP 45/2014, as determinações de glicerol livre e total devem ser realizadas empregando a norma ASTM D 6584 (2017), da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), as normas EN ISO 14105 (2011), EN ISO 14106 (2003), do *European Committee for Standardization* (CEN) ou as normas ABNT NBR 15908 (2015) e ABNT NBR 15771 (2009), da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (ANP, 2014).

Excluindo-se a ABNT NBR 15771, as metodologias destacadas utilizam a cromatografia gasosa de alta resolução com detector de ionização em chama (GC-FID) como técnica analítica, que apresenta um limite de detecção de 0,005% m/m para o glicerol livre e 0,05% m/m para o glicerol total. Entretanto, o uso da GC-FID requer equipamentos e reagentes de custo elevado, preparação laboriosa de amostra, além do uso de substâncias tóxicas, tal como a piridina. Dessa maneira, os requisitos para a utilização desta técnica a torna menos acessível e aplicável em laboratórios de usinas de pequeno porte de produção de biodiesel, que projetam desde a extração da matéria-prima até o controle de qualidade para o atendimento das especificações do biocombustível.

Diversos métodos analíticos alternativos vêm sendo desenvolvidos para a determinação de glicerol livre em biodiesel, baseados em técnicas cromatográficas, eletroanalíticas, enzimáticas, espectrofotométricas e titrimétricas (QUADROS et al., 2011). Metodologias baseadas na oxidação do glicerol com o periodato, segundo a Reação de Malaprade, têm se destacado na literatura e envolve o uso de diversas técnicas analíticas, e produz aldeído fórmico, ácido fórmico, iodato e água (Figura 1).

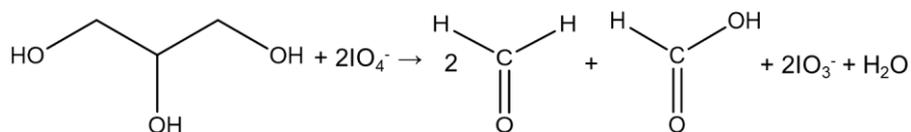


Figura 1. Reação Malaprade: oxidação do glicerol pelo íon periodato formando o aldeído fórmico, ácido fórmico, iodato e água

Com base nesta reação, a determinação do glicerol livre em biodiesel é, geralmente, feita a partir da Reação de Hantzsch, que envolve a ciclização do aldeído fórmico com a acetilacetona ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$), produzindo um composto de baixa estabilidade, tóxico e inflamável: a 3,5-diacetil-1,4-di-hidrolutidina ($\text{C}_{11}\text{NO}_2\text{H}_{15}$), um composto esverdeado com absorvância máxima em 410 nm (Figura 2) (MERCK, 2018; BONDIOLI & BELLA, 2005).

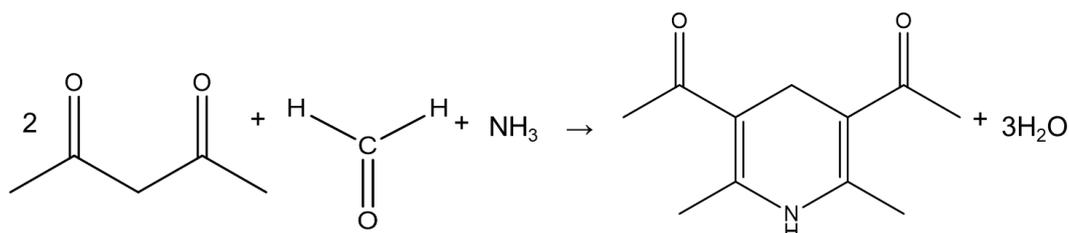


Figura 2. Reação de Hantzsch: ciclização da acetilacetona com aldeído fórmico, em meio amoniacal, formando a 3,5-diacetil-1,4-di-hidrolutidina e água

Alternativamente, alguns autores se baseiam no ácido fórmico formado na Reação de Malaprade realizando a sua titulação com uma base forte, como o NaOH. Entretanto, essa metodologia é laboriosa e apresenta interferentes, tal como o CO_2 atmosférico, que reage com a base (PISARELLO et al., 2010).

A quantificação do glicerol livre em biodiesel via determinação do iodato produzido na reação de Malaprade não tem sido empregada até o momento, possivelmente devido à interferência do periodato remanescente que, de maneira geral, participa das mesmas reações que ocorre com o iodato. Entretanto, Belcher e Townshend (1968) realizaram a complexação do periodato presente em solução aquosa contendo iodato em pH 2,9. Posteriormente, Nakashima e colaboradores (1999) realizaram o mascaramento do periodato, de forma rápida e seletiva, pelo íon molibdato na faixa de pH 3,0 a 4,5 (Figura 3), em matrizes aquosas contendo iodato. O complexo formado ($[\text{I}(\text{MoO}_4)_6]^{5-}$) demonstrou ser estável por até uma semana nessa condição, permitindo assim, a determinação do iodato.

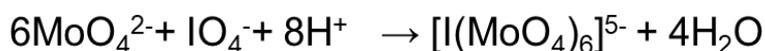


Figura 3. Reação de mascaramento do periodato pelo íon molibdato

A partir do exposto, o objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de um método simples, rápido e de baixo custo para a determinação de glicerol livre em amostras de biodiesel proveniente de diferentes matérias-primas, baseado no iodato produzido na reação de Malaprade, mascaramento do periodato remanescente pelo íon molibdato e determinação iodométrica empregando as técnicas espectrofotométrica e titrimétrica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel

O biodiesel é uma mistura de ésteres mono-alquílicos obtidos, geralmente, através de reação de transesterificação de matérias-primas renováveis (óleos vegetais, gorduras animais ou óleos de microalgas). Nesta reação ocorre a transformação dos triglicerídeos em ésteres de ácidos graxos mono-alquílicos, pela substituição da porção glicerol por um álcool de cadeia curta. Três reações reversíveis e consecutivas ocorrem no processo, nas quais os diglicerídeos e os monoglicerídeos são formados como intermediários. Para cada molécula de triglicerídeo são consumidas três moléculas de álcool, produzindo três moléculas de mono-alquil ésteres e uma molécula de glicerol (Figura 4) (MENEGETTI et al., 2013).

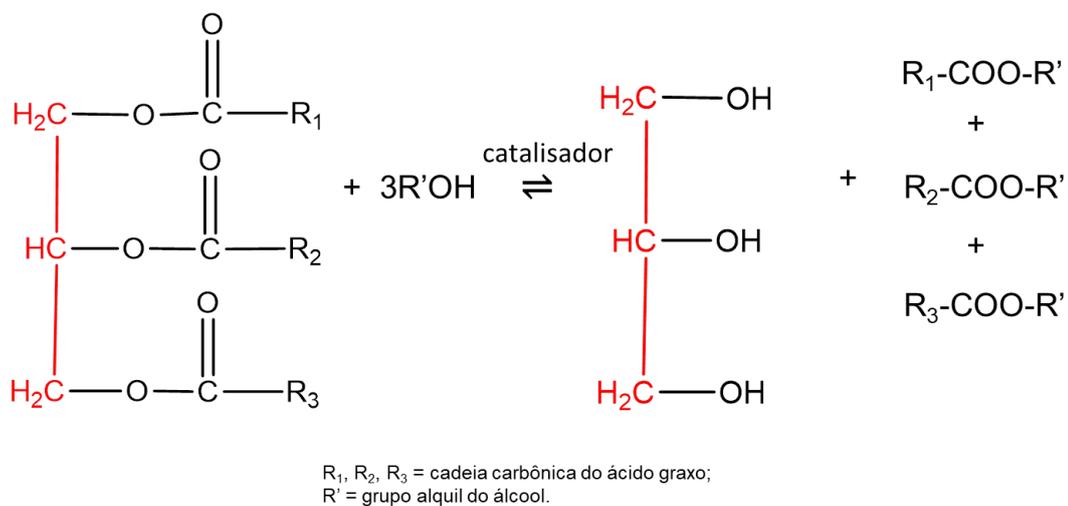


Figura 4. Reação genérica de transesterificação de um triglicerídeo com um álcool, na presença de um catalisador, formando glicerol e ésteres monoalquílicos

Para a obtenção de uma taxa de conversão aceitável, como a reação é reversível, é requerido o uso de catalisadores que, de maneira geral, são classificados como homogêneos, heterogêneos ou enzimáticos e um excesso de álcool para a formação dos produtos (CREMONEZ et al., 2015).

Além disso, o excesso de álcool contribui para a separação do glicerol da fase do biodiesel (CREMONEZ et al., 2015). A utilização de álcoois de cadeia curta é preferível por promoverem reações mais rápidas, além do baixo custo. O metanol é o álcool mais utilizado na síntese do biodiesel (PROKOPOWICZ, 2015; BALAT & BALAT, 2008).

Os catalisadores básicos mais utilizados na reação de transesterificação são os metóxidos e hidróxidos de sódio e potássio. Dentre estes, os metóxidos são mais reativos e caros, enquanto os hidróxidos promovem a formação de sabões, mesmo que a matéria-prima esteja isenta de água e ácidos graxos livres (MA & HANNA, 1999). Na prática, utiliza-se um excesso de álcool em proporções molares superiores a 6:1 nas catálises básicas, e 30:1 nas catálises ácidas. A catálise básica permite um maior rendimento em comparação à catálise ácida, porém promove a saponificação dos ésteres como reação paralela (PROKOPOWICZ, 2015; BALAT & BALAT, 2008).

Outros fatores promovem o desvio da rota de síntese desejada (reação de transesterificação), formando sabões, o que diminui o rendimento e dificulta a separação do produto pela formação de emulsão. Os fatores que têm que ser controlados são: a temperatura

de reação, que deve ser mantida próxima e abaixo da temperatura de ebulição do álcool; a síntese em meio anidro; e o índice de acidez dos óleos deve ser suficientemente baixo (MA & HANNA, 1999).

Uma alternativa utilizada para diminuir o índice de acidez nos óleos é o emprego da reação de esterificação dos ácidos graxos do óleo. O mecanismo desta reação se baseia na protonação do grupo carbonila do ácido graxo, formando um carbocátion. A carbonila sofre um ataque nucleofílico pelo álcool e produz um intermediário tetraédrico. Após, o intermediário libera uma molécula de água, forma um éster e o catalisador ácido é regenerado (Figura 5) (CAVALCANTE, et al., 2015).

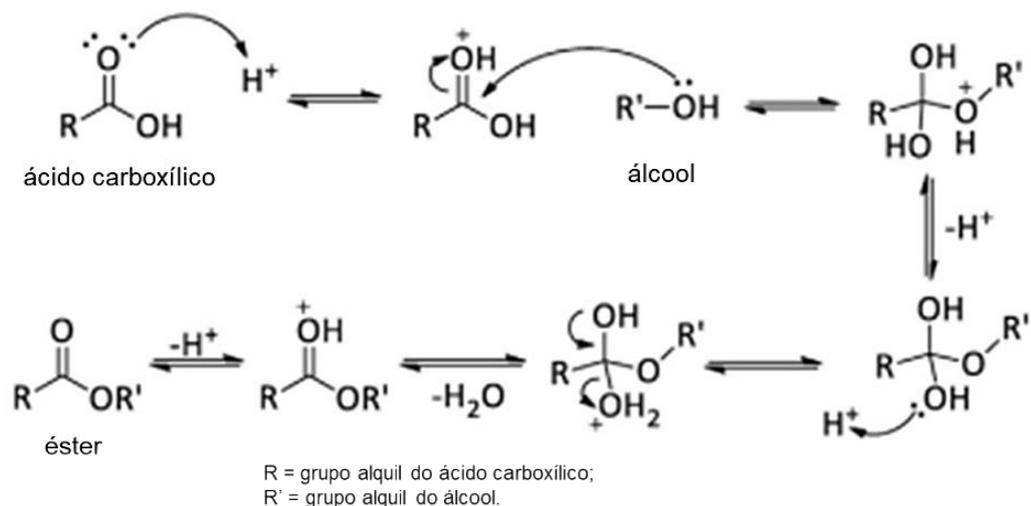


Figura 5. Mecanismo geral da reação de esterificação de um ácido graxo com um álcool em meio ácido, formando éster e água (CAVALCANTE, et al., 2015)

As matérias-primas de origem vegetal mais utilizadas na produção do biodiesel dependem do solo, da geografia, do clima e economia do local, pois influenciam no desenvolvimento das culturas de oleaginosas, em termos de produtividade e custos. No Brasil, segundo o boletim mensal do biodiesel publicado pela ANP (2019), o primeiro semestre de 2019 contou com 70,12% da produção de biodiesel a partir do óleo de soja, 11,83% com gordura bovina, 11,58% com misturas de materiais graxos tradicionais reprocessados, 1,94% com gordura de porco, 1,92% com óleo de palmiste e apenas 2,62% com as demais fontes. No mesmo período do ano, foram produzidos 2.668.193 m³ de biodiesel, sendo as regiões Centro-oeste (41,6%) e Sul (41,1%) responsáveis pela maior parte da produção frente às regiões Sudeste (8,1%), Nordeste (7,5%) e Norte (1,7%) do país.

A determinação das características do biodiesel utilizado como combustível é necessária para atestar a sua qualidade. A qualidade do biodiesel está diretamente associada ao bom desempenho do motor e consumo de combustível, à preservação do meio ambiente e à garantia na segurança, transporte e manuseio desse biocombustível (QUADROS et al., 2011).

No Brasil, os padrões de qualidade para comercialização do biodiesel adicionado ao diesel são estabelecidos pela ANP, através da RANP 45/2014. Segundo a ANP (2014), a determinação dos teores de contaminantes deve ser realizada mediante o emprego de métodos presentes nas normas da ABNT, ASTM, ISO e CEN. Os teores limites para padrões de qualidade do biodiesel determinados pela ANP são baseados na norma americana ASTM D6751 e na norma europeia EN 14214. A Tabela 1 apresenta alguns teores limites estabelecidos pela ANP (2014), e os métodos de ensaio recomendados.

Tabela 1. Especificações do Biodiesel e Métodos de Análise

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITES ANP 07/2008	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISSO
Aspecto	-	Límpido e isento de impurezas	-	-	-
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15771 15908	6584	EN 14105 EN 14106
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344 15908	6584	EN 14105
Monoacilglicerol	% massa	0,7	15342 15344 15908	6584	EN 14105
Diacilglicerol	% massa	0,20	15342 15344 15908	6584	EN 14105
Triacilglicerol	% massa	0,20	15342 15344 15908	6584	EN 14105
Metanol ou etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Teor de éster, min.	% massa	96,5	15764	-	EN 14103
Índice de acidez, máx.	mg g ⁻¹ KOH	0,50	14448	664	EN 14104
Índice de iodo	% massa	Anotar	-	-	EN 14111
Água, máx	mg kg ⁻¹	200		6304	EN ISO 12937
Estabilidade à oxidação a 110 °C, mín.	h	6	-	-	EN 14112 EN 15751
Massa específica (20 °C)	kg m ⁻³	850 – 900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 EN ISO 12185

Fonte: Adaptado de RESOLUÇÃO ANP nº 45, de 25 de agosto de 2014

O uso do biodiesel como combustível alternativo engloba benefícios econômicos, tais como a grande disponibilidade de matéria-prima, baixo custo de produção e a diminuição da

importação do diesel; ambientais, tais como a baixa emissão de partículas de carvão e gases tóxicos na combustão, além de sua biodegradabilidade e natureza renovável, que contribui para a diminuição dos níveis de CO₂ no ar; técnicos, como a necessidade de menor quantidade de oxigênio para a queima, baixo risco de explosão e lubrificidade otimizada em comparação ao diesel; e sociais, como a geração de empregos no setor primário e favorecimento ao pequeno produtor rural (BIODIESELBR, 2011).

Apesar destas vantagens, o uso do motor a diesel ainda não é permitido em carros de passeio e o uso do biodiesel em regiões muito frias pode levar à cristalização deste biocombustível, prejudicando o funcionamento do motor. O biodiesel ainda possui maior absorção de água que o diesel, o que leva ao aumento da corrosividade do biocombustível. Quanto à emissão de gases na atmosfera, os NO_x são os únicos gases prejudiciais que são liberados em maior quantidade pelo uso do biodiesel em comparação ao diesel de petróleo (BIODIESELBR, 2011).

Os contaminantes presentes no biodiesel, sejam oriundos da matéria-prima ou da reação de transesterificação, podem alterar suas propriedades físicas e químicas, o que torna imprescindível o uso de métodos de purificação. A lavagem do biodiesel empregando água vem sendo pouco utilizada, devido ao grande volume de água necessário, e ao número de etapas envolvidas no processo de lavagem, geração de efluentes e contaminação dos ésteres com traços de água emulsionada, o que facilita a proliferação de micro-organismos e o processo corrosivo em materiais metálicos. Uma alternativa é o uso de diferentes adsorventes específicos para a purificação do biodiesel, baseados no princípio da adsorção ácida e básica, pela forte interação com compostos polares, tais como metanol, glicerol, glicerídeos, íons metálicos e sabão (PICCIN et al., 2015; MARQUES, 2012).

2.2 Glicerol

O glicerol é um tri-álcool com três átomos de carbono e apresenta o nome sistemático 1,2,3-propanotriol (Figura 6). Esse composto se apresenta como um líquido incolor, inodoro, de gosto adocicado, viscoso, higroscópico e solúvel em água, formando ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (BEATRIZ et al., 2011). A Tabela 2 descreve as principais propriedades físico-químicas do glicerol a 20 °C.

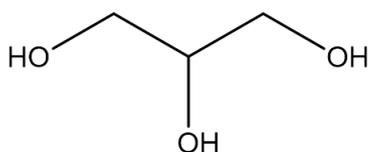


Figura 6. Fórmula estrutural do glicerol

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do glicerol, a 20 °C

Fórmula Molecular	C ₃ H ₈ O ₃
Massa Molar	92,09382 g mol ⁻¹
Densidade	1,261 g cm ⁻³
Viscosidade	1,5 Pa s
Ponto de Fusão	18,2 °C
Ponto de Ebulição	290 °C
Calorias	4,32 kcal g ⁻¹
Ponto de Fulgor	160 °C
Tensão superficial	64 mN m ⁻¹

Fonte: LIDE, 2006.

O glicerol pode ser encontrado em sua forma combinada quando está ligado a ácidos graxos, formando acilglicerídeos que estão contidos em todos os óleos vegetais ou de microalgas e gorduras animais. Por outro lado, o glicerol se apresenta em sua forma livre quando é liberado da cadeia graxa, sendo, portanto o somatório do conteúdo de glicerol livre e acilglicerídeos denominado de glicerol total (ARRUDA et al., 2006).

Conforme relatado anteriormente, o glicerol é o coproduto da reação de transesterificação empregada na síntese do biodiesel. Após esta reação, o processo de purificação do biodiesel é facilitado pela decantação do glicerol, na qual há a formação de uma fase rica em álcool (mais densa), contendo a maior parte do glicerol, e outra fase rica em biodiesel (menos densa). Para cada 90 m³ de biodiesel produzido, são formados 10 m³ de glicerol, ou seja, cerca de 10% do volume de toda a produção corresponde ao glicerol (ARRUDA et al., 2006).

O termo glicerina se refere apenas às formas comercializadas e purificadas com teores de glicerol inferiores a 95% m/m. A glicerina produzida na reação de transesterificação contém cerca de 20% de impurezas, nas quais se destacam os álcoois, catalisadores, sais, ácidos graxos e água. Por essa razão, a glicerina apresenta poucas aplicações, levando à necessidade de sua purificação. Processos de destilação sob pressão reduzida, eletrodiálise e resinas de troca iônica para uso em indústria são empregados para esta finalidade (MOTA, 2011; BEATRIZ et al., 2011).

Em razão da grande aplicabilidade do glicerol purificado, diversas metodologias são empregadas para determiná-lo em diferentes matrizes. O teor de glicerol livre no biodiesel é um parâmetro determinado para caracterizar a qualidade e eficiência da purificação deste biocombustível. O glicerol livre presente em misturas diesel-biodiesel pode gerar problemas em tanques de estocagem de combustíveis, devido à separação do glicerol, e provoca problemas de entupimento e formação de depósitos em partes do motor, comprometendo o processo de combustão e o seu desempenho. Se a queima do combustível ultrapassar a temperatura de 180 °C, o glicerol sofre desidratação, levando à emissão da acroleína, um aldeído altamente tóxico (APOLINÁRIO et al., 2012; ARRUDA et al., 2006; NEHER, 1995).

2.3 Métodos Oficiais para a Determinação de Glicerol Livre em Biodiesel

No Brasil, os métodos oficiais para determinação de glicerol livre em biodiesel são estabelecidos pela ANP e utilizam a Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama (GC-FID) (ASTM D6584, EN ISO 14105, EN ISO 14106, e ABNT NBR 15908) e a titrimetria (ABNT NBR 15771) como técnicas analíticas (ANP, 2014).

Os métodos que empregam a técnica cromatográfica, utilizam a derivatização do glicerol com N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) e utilização de padrão interno 1,2,4 butanotriol (ASTM D6584, EN ISO 14105, EN ISO 14106) ou etilenoglicol (ABNT NBR 15908), além de empregar programações variadas de temperatura no forno cromatográfico.

O método titrimétrico ABNT NBR 15771 se baseia na iodometria. Neste método, o glicerol é extraído por partição pela adição de éter etílico e água acidificada. Posteriormente, à fase aquosa é adicionado ácido periódico para oxidação do glicerol. Em paralelo, é feita a análise do branco, que corresponde à água deionizada (em substituição ao extrato aquoso). Após 30 minutos de reação no escuro, é adicionado iodeto de potássio, formando tri-iodeto que, após 1 a 5 minutos, é titulado com solução de Na₂S₂O₃ 0,05 mol L⁻¹, em presença de solução indicadora de amido. Entretanto, esse método utiliza grande quantidade de amostra e demanda um tempo longo de análise. Além disso, a quantidade de reagentes utilizada na

metodologia pode variar em função da diferença entre os volumes de titulante medidos no branco e na amostra, havendo a necessidade da repetição desta análise.

A determinação do glicerol livre recomendada pelo método ABNT NBR 15771, inclui o biodiesel obtido de todas as matérias-primas, assim como a ABNT NBR 15908, com exclusão ao óleo de mamona. Os outros métodos oficiais estabelecidos pela ANP (2014) foram desenvolvidos com base no biodiesel metílico proveniente do óleo de soja (ASTM D 6584 e EN ISO 14105), canola e girassol (EN ISO 14105 e EN ISO 14106), e precisam ser validados caso sejam utilizados para análise de biodiesel de diferentes matérias-primas. Vale ressaltar que a metodologia descrita pela ASTM D 6584 não é aplicável a biodieseis metílicos provenientes de óleo com predominância de ácido láurico (dodecanóico), tais como óleo de coco e palmiste.

No Brasil, há uma diversidade de matérias-primas que podem ser utilizadas na produção do biodiesel, envolvendo diversas rotas de síntese, reagentes e métodos de purificação, o que pode não refletir a realidade do biodiesel empregado no desenvolvimento de métodos oficiais internacionais. Assim, é necessário considerar metodologias alternativas que se apliquem ao domínio desse biocombustível (QUADROS et al., 2011).

2.4 Métodos Alternativos para a Determinação de Glicerol Livre em Biodiesel

Diversos métodos cromatográficos têm sido desenvolvidos para a determinação de glicerol livre em biodiesel, embora envolvam, geralmente, um longo tempo de análise e custo elevado. A cromatografia é um método de separação dos componentes de uma amostra, na qual um solvente (fase móvel) elui através de uma fase estacionária. À medida que a fase móvel percorre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos em ambas as fases, de maneira que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária. A fase móvel é um líquido ou gás inerte e a separação ocorre em razão das interações das moléculas da amostra com a fase estacionária contida na coluna que, no caso da cromatografia gasosa, é auxiliada pelo gradiente de temperatura (COLLINS et al., 2006).

As análises relativas ao biodiesel envolvem, geralmente, a cromatografia a gás com detector de ionização por chama (GC-FID) ou por espectrometria de massas (GC-MS). O detector de ionização por chama envolve o monitoramento da corrente produzida através de íons e elétrons provenientes da queima do gás de arraste com a amostra, em chama ar/hidrogênio, após percolar a coluna. Na detecção por espectrometria de massas as moléculas da amostra entram em uma fonte de ionização, formando íons que são acelerados, por um campo elétrico, e depois são separados de acordo com a razão entre suas massas e suas cargas elétricas (COLLINS et al., 2006).

Mittelbach e colaboradores (1996) determinaram os teores de metanol e glicerol livre em biodiesel, simultaneamente, visto que as normas oficiais empregam metodologias diferentes para a determinação destes analitos. Neste método, as amostras, juntamente com o etanol e o 1,4 butanodiol (padrões internos), foram solubilizados em dimetilformamida (DMF) e derivatizados com N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA). As amostras foram analisadas, após os 30 minutos de derivatização, comparando duas técnicas cromatográficas distintas (GC-FID e GC-MS). Segundo os autores, ambos os sistemas de detecção mostraram boa sensibilidade, reprodutibilidade e recuperação para o glicerol.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utiliza a fase móvel líquida, e é vastamente empregada na determinação do glicerol em biodiesel com variadas técnicas de detecção, como por pulso amperométrico (HPLC-PAD) (LOZANO et al., 1996) e por refratometria (HPLC-RID) (HAJÉK et al., 2006).

Lozano e colaboradores (1996) determinaram o teor de glicerol livre em biodiesel realizando o procedimento de extração do glicerol com mistura heterogênea água:hexano,

empregando agitação por 30 minutos, e repouso por 2 horas. Uma seringa com filtro de Nylon[®] hidrofílico foi utilizada para retirar a fase aquosa para análise por HPLC-PAD. O método foi empregado na determinação do teor de glicerol livre em ésteres metílicos e etílicos derivados dos óleos de colza e algodão. Embora o método tenha apresentado uma exatidão aceitável e baixo limite de detecção (0,0010% m/m), demandou um longo tempo de análise.

Hajék e colaboradores (2006) apresentaram um método de determinação de glicerol livre em biodiesel por HPLC-RID, utilizando água deionizada como eluente. O método foi baseado na extração do glicerol com água, utilizando-se um funil de separação conectado a uma bomba de vácuo. A mistura foi agitada por 30 minutos e, após 2 horas para a separação de fases, a porção aquosa foi concentrada por evaporação e analisada por HPLC-RID. O método proposto demonstrou limite de detecção baixo (0,0060% m/m) e foi ambientalmente correto. Contudo, o procedimento completo durou aproximadamente 3 horas e necessitou de cuidados na etapa de concentração da amostra.

Métodos alternativos não cromatográficos também são citados na literatura para determinação de glicerol livre em biodiesel. Esses métodos incluem determinações eletroanalíticas, enzimáticas e métodos que utilizam a oxidação do glicerol com periodato, seguida por determinações espectrofotométricas ou titrimétricas.

As técnicas eletroanalíticas geralmente se baseiam em reações de oxidação-redução e envolvem a medida de propriedades elétricas de um analito, como a diferença de potencial, carga, resistência e corrente. Apesar de essas técnicas fornecerem baixos limites de detecção e apresentarem menor custo, quando comparadas às técnicas cromatográficas, necessitam de um preparo aprimorado de amostra para evitar interferências, devido à sua baixa seletividade eletroquímica (HARRIS, 2005).

Lourenço e Stradiotto (2009) desenvolveram um método, barato e de boa reprodutibilidade, para a determinação de glicerina livre em biodiesel de soja, baseado na eletro-oxidação do glicerol em solução de ácido perclórico, em contato com eletrodos de platina por potenciometria cíclica, utilizando o eletrodo Ag/AgCl_(sat) como referência. A extração do glicerol foi realizada com água. A fase aquosa foi eluída em uma coluna C18, previamente condicionada com acetona e água. Após, foi realizada a evaporação da fase aquosa para concentrar o analito e eliminar o metanol (interferente) através de um evaporador rotativo (26,7 kPa, a 80 °C, por 7 minutos). No entanto, o método proposto demanda cerca de 2,5 horas para uma análise completa.

Barbosa (2012) propôs a determinação de glicerol livre em biodiesel através do método amperométrico, utilizando eletrodo de ouro como detector, acoplado a um sistema de injeção em fluxo (FIA). Inicialmente, o glicerol foi extraído do biodiesel para a fase aquosa, empregando agitador de tubos tipo vórtex e, posterior, centrifugação. Segundo o autor a análise resultou em uma boa reprodutibilidade, alta frequência analítica (100 injeções h⁻¹), bons valores de recuperação (96% a 117%) e baixos limites de detecção (14,73 µmol L⁻¹) e quantificação (49,10 µmol L⁻¹).

Outro conjunto de métodos utilizados para a determinação do glicerol envolve o uso de técnicas enzimáticas, devido à seletividade e ação catalítica das enzimas. Contudo, sua condição de operação envolve parâmetros e cuidados específicos, como tipo de solvente, concentração, pH e temperatura.

Luetkmeyer e colaboradores (2010) desenvolveram um método eletro-enzimático para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel, utilizando um eletrodo tipo Clark para o oxigênio, baseado na atividade de duas enzimas acopladas: glicerolinase e glicerol-3-fosfato oxidase. O glicerol livre foi separado do biodiesel por partição, empregando mistura de água com álcool etílico, para extrair o glicerol livre, e n-heptano, para a extração do biodiesel. A determinação do glicerol total foi realizada pela saponificação prévia dos ésteres com KOH 3% m/m, em álcool etílico, a 60 °C, por 30 minutos, para liberar o glicerol ligado para que o

mesmo pudesse ser determinado como o glicerol livre. Nesta metodologia, a conversão do glicerol através da ação sequencial das enzimas ocorre com o consumo de oxigênio medido por amperometria, que é proporcional ao conteúdo de glicerol livre na amostra. O método apresentou boa linearidade ($r = 0,9990$) e baixo limite de detecção ($0,00001\% \text{ m/v}$).

Valdez e colaboradores (2012) propuseram um método de determinação de glicerol em biodiesel de soja utilizando as enzimas glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase. A metodologia se baseou na conversão do glicerol, produzindo peróxido de hidrogênio, que foi removido pela ação da enzima peroxidase. A ação da peroxidase resultou na produção de água e de um composto colorido que foi determinado em 505 nm, por espectrofotometria de absorção molecular no UV-Vis. O método apresentou um coeficiente de correlação, r , de 0,9937 e um limite de detecção de $7,10 \times 10^{-6}\% \text{ m/m}$.

De acordo com a literatura, métodos de oxidação do glicerol utilizando o periodato vêm sendo muito aplicados nas análises de diferentes matrizes, empregando técnicas espectrofotométricas e titrimétricas.

2.5 Métodos para a Determinação do Glicerol envolvendo a Oxidação com o Periodato

Malaprade (1928) propôs uma reação rápida de clivagem de polióis por ácido periódico, e posteriormente, Fleury e Lange (1932) relataram que a reação de Malaprade ocorre apenas em compostos com grupos hidroxil adjacentes. Criegee e colaboradores (1933) propuseram um mecanismo geral para a reação de oxidação de Malaprade de um α -glicol com o ácido periódico (PERLIN, 2006), que aplicado ao glicerol apresenta o mecanismo formulado (Figura 7).

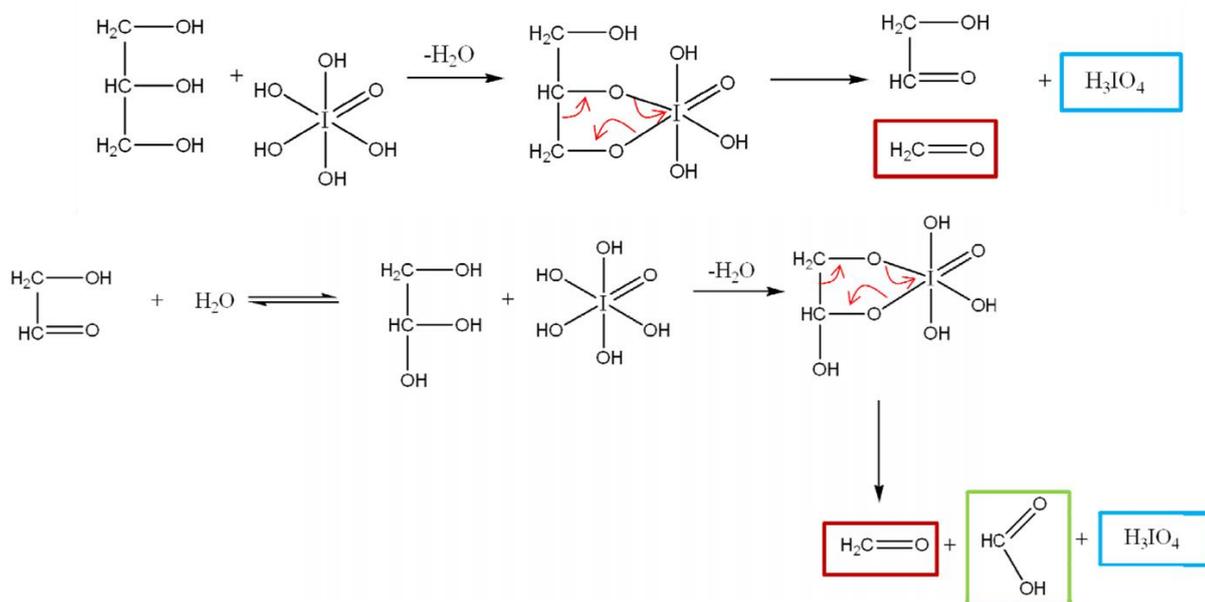


Figura 7. Mecanismo da Reação de Malaprade do glicerol com ácido periódico (NOGUEIRA, 2011)

O glicerol é um α -glicol que, quando é oxidado pelo íon periodato ou ácido periódico, forma aldeído fórmico, ácido fórmico, iodato ou ácido iódico e água como produtos (Figuras 1 e 7). As metodologias descritas na literatura que empregam a oxidação do glicerol com periodato utilizam técnicas analíticas baseadas na formação do ácido fórmico, do aldeído fórmico e do iodato produzidos.

Um método titrimétrico para a quantificação de glicerol livre baseado na determinação do ácido fórmico é recomendado na norma ASTM 7637 (2015) para amostras de água. Neste método, o glicerol livre é oxidado com o periodato de sódio, em meio fortemente ácido e, posteriormente, o ácido fórmico produzido é titulado com NaOH 0,1 mol L⁻¹ até pH 8,1 ± 0,1, utilizando o azul de bromotimol como indicador. No entanto, esta norma é aplicável apenas a misturas aquosas com teores de glicerol acima de 75% m/m e tem como interferente o dióxido de carbono, que deve ser eliminado a partir da fervura da solução. Sendo assim, o preparo de amostra aquosa é laborioso e a análise deve demandar pouco mais de 50 minutos.

A norma AOAC 942.22 (1990) também descreve uma metodologia para a determinação do glicerol livre via ácido fórmico, entretanto aplicada, especificamente, para a análise de cosmético utilizado para proteção da pele (*vanishing cream*). Neste método, o glicerol é separado da matriz por partição com água acidificada e sucessivas porções de clorofórmio. Posteriormente, o glicerol é oxidado com periodato de potássio, a mistura é diluída e fica em repouso durante 1 hora. Em seguida é adicionado propilenoglicol para eliminar o excesso do periodato, sendo formado, portanto, apenas aldeído fórmico, iodato e água. Nesta reação o ácido fórmico não é produzido, pois o propilenoglicol apresenta apenas dois grupos hidroxila adjacentes, diferentemente do glicerol com um grupo hidroxila a mais. Finalmente, o ácido fórmico produzido na oxidação do glicerol é titulado contra solução padrão de NaOH 0,02 mol L⁻¹, na presença do indicador púrpura de bromocresol.

Outra metodologia baseada na determinação do ácido fórmico produzido foi desenvolvida por Pisarello e colaboradores (2010). Tais autores determinaram o glicerol livre e total em biodiesel. Para a determinação do glicerol total, o biodiesel foi submetido à metanólise com catalisador metóxido de sódio por 2,5 h, a 60 °C, para desprendimento da porção glicerol dos mono, di e triglicerídeos. O produto foi extraído com solução de HCl diluído e determinado empregando, em linhas gerais, o seguinte procedimento: neutralização com NaOH 2 mol L⁻¹, monitorada com o indicador vermelho de fenol; adição de HCl 5 % m/m e fervura por 3 minutos, para eliminação do CO₂; titulação com NaOH 0,1 mol L⁻¹, até coloração fúcsia; oxidação do glicerol com periodato de sódio, por 30 minutos, produzindo ácido fórmico; eliminação do periodato excedente com etilenoglicol, por 20 minutos; e titulação do ácido fórmico produzido, com solução padrão de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹. O mesmo procedimento de análise foi realizado para a determinação do glicerol livre, excluindo-se a etapa de metanólise do biodiesel. A metodologia descreveu uma faixa de detecção entre 0,0009 e 0,37% m/m para o glicerol livre e 0,0046 e 5,15% m/m para o glicerol total. Entretanto a análise demanda diversas etapas, longo tempo para as reações de oxidação do glicerol e do etilenoglicol, manutenção de ambiente livre de luz, além de cuidados especiais devido à presença de CO₂.

Os métodos normalmente empregados para a quantificação de glicerol livre baseado na determinação do aldeído fórmico, produzido na oxidação do glicerol com periodato, envolvem a técnica espectrofotométrica. Nestes métodos, o aldeído fórmico reage com acetilacetona, em tampão de acetato de amônio, produzindo o composto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (Figura 2), com máxima absorvância em 410 nm. Embora apresente maior capacidade de detecção que os métodos titulométricos citados até o momento, o uso da acetilacetona exige cuidados especiais devido à sua baixa estabilidade e toxicidade (MERCK, 2018; LÔBO et al., 2009).

Pinzi e colaboradores (2009) utilizaram um sistema de injeção em fluxo (FIA) para a determinação de glicerol livre e total em biodieseis de girassol, milho e oliva, via quantificação do aldeído fórmico pela formação da 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina. Para a determinação do teor de glicerol total, os autores realizaram a saponificação dos biodieseis com etilato de potássio e extração líquido-líquido com mistura etanol-água para a remoção do glicerol, anteriormente à sua oxidação. Os autores relataram que o método proposto é

adequado para a análise do biodiesel no momento de sua produção e que o método apresentou menor custo quando comparado à cromatografia gasosa, sendo seu limite de detecção (0,0028% m/m) menor que o limite previsto pelas normas oficiais. Além disso, o método apresenta as vantagens de automação, frequência analítica e menor contaminação externa.

Ribeiro e colaboradores (2013) realizaram a determinação espectrofotométrica de glicerol livre *in situ* igualmente baseada na formação da 3,5-diacetil-1,4-di-hidrolutidina, porém fazendo a adição de padrões de glicerol nas amostras de biodiesel (método de adição padrão), eliminando a extração do analito. Na metodologia, foi utilizado um excesso de etanol anidro para a dissolução dos biodieseis de soja, algodão e mamona, junto com periodato de sódio e acetilacetona, assegurando a formação de uma única fase antes das medições espectrofotométricas, em absorvância de 410 nm. O limite de detecção encontrado foi de $2,0 \times 10^{-4}$ % m/m.

Uma variação da determinação do glicerol baseada na formação da 3,5-diacetil-1,4-di-hidrolutidina, produzida na ciclização do aldeído fórmico com a acetilacetona, foi proposta por Lima e colaboradores (2012), que empregaram medidas fluorimétricas da 3,5-diacetil-1,4-di-hidrolutidina, em 514 nm. Para tal, os autores empregaram um método automático contínuo, *flow-batch* (FB), na análise do biodiesel de soja. O limite de detecção encontrado pelo método foi de $3,6 \times 10^{-6}$ % m/v.

Há poucas referências na literatura envolvendo a quantificação do iodato formado na oxidação do glicerol com periodato, para análise de biodiesel. Um método de análise foi proposto por Gonçalves e Micke (2007), que utilizaram a eletroforese capilar para a determinação de glicerol livre em biodiesel de gordura de frango, óleo de soja e mamona. Inicialmente, o glicerol foi separado do biodiesel por partição com água e clorofórmio e, posteriormente, foi oxidado pelo periodato, levando à formação do iodato, que foi determinado por eletroforese capilar, utilizando o nitrato de sódio como padrão interno. Segundo os autores, o método apresentou coeficiente de correlação de 0,9991, limite de detecção de $4,3 \times 10^{-4}$ % m/m no biodiesel e recuperação entre 95,4% e 102,4%.

Outro método para a determinação do glicerol livre no biodiesel a partir do iodato é recomendado pela ABNT, através da norma ABNT NBR 15771. Neste método, o glicerol é oxidado pelo periodato, produzindo iodato e, após, é realizada a titulação iodométrica de ambos (iodato e periodato excedente). A titulação de um branco permite quantificar o periodato total que foi adicionado para a oxidação da amostra. O iodato formado na reação é, então, determinado pela diferença entre os volumes de titulante gastos na titulação do branco e da amostra. Conforme relatado previamente, no tópico 2.3, este método apresenta algumas desvantagens como: necessidade de grande quantidade de amostra, o que aumenta o tempo do procedimento de extração do analito e a sua complexidade; longo tempo requerido para a oxidação do analito; e reanálises (dependendo da relação do volume de padrão gasto na titulação da amostra e com o branco).

Os inconvenientes do método da ABNT NBR 15771 estão relacionados, principalmente, à necessidade de utilizar um grande excesso de periodato para a oxidação do glicerol e à baixa quantidade deste analito presente no biodiesel. Estes fatores fazem com que o volume de titulante gasto na titulação da amostra fique próximo ao do branco. Por esta razão, o método emprega quantidade relativamente alta de biodiesel e recomenda reanálises empregando diferentes alíquotas de amostras e/ou de solução de periodato, de modo a se obter uma diferença de volumes razoável. Tais reanálises, aliadas às extrações sucessivas do analito em funil de separação, tornam a execução deste método laboriosa.

Se por um lado o emprego de excesso de periodato é prejudicial ao método da ABNT (NBR 15771) por aumentar o volume gasto de titulante na titulação do branco e da amostra, por outro lado, diminuir a quantidade de periodato irá diminuir a velocidade de oxidação do glicerol, aumentando o tempo requerido para esta etapa. Isto, possivelmente, pode introduzir

erros sistemáticos provocados pela degradação do periodato e/ou oxidação incompleta do glicerol.

Para diminuir esses inconvenientes, idealmente, deveria ser empregado um excesso de periodato na oxidação do glicerol (aumentando a velocidade da reação) e, na etapa de titulação, deveria ser utilizado um agente mascarante para o periodato excedente, de modo que apenas o iodato participe da titulação iodométrica. Neste caso, o volume do titulante gasto fica diretamente relacionado à quantidade de glicerol.

Apesar de o método da ABNT (NBR 15771) ser o único encontrado na literatura que utiliza o método iodométrico para a determinação de glicerol livre em biodiesel, a iodometria tem sido bastante empregada para a determinação de glicerol em diferentes matrizes.

2.6 Métodos Iodométricos para a Determinação de Glicerol Livre

A iodometria consiste em um conjunto de métodos baseados na determinação do iodo (ou tri-iodeto) estequiometricamente associado a um analito. Diversos trabalhos têm empregado a reação de Dushman, que consiste na redução do iodato pelo iodeto, produzindo o ânion tri-iodeto (Reação 1). Em pH acima de 7, o ânion iodato se comporta como agente oxidante fraco, isto é, não oxida o íon iodeto à tri-iodeto. No entanto, em meio ácido, além do íon iodato, o periodato reage com o íon iodeto, formando o íon tri-iodeto (Reação 2) (BURGOT, 2012; DUSHMAN, 1904).



Segundo Dushman (1904), a velocidade de reação do iodato com o iodeto é maior quanto menor o pH do meio. O iodo formado não é estável (Reação 3) e a sua volatilização pode ser minimizada pelo deslocamento do equilíbrio provocado por um excesso de iodeto adicionado ao meio, formando o tri-iodeto.



A determinação do tri-iodeto produzido na Reação de Dushman (Reação 1), pode ser realizada empregando as técnicas espectrofotométrica e titrimétrica. Em ambas, o uso do amido é recomendado para intensificar a capacidade de detecção dos métodos. Neste caso, a sensibilidade é aumentada devido à formação do complexo amido-tri-iodeto de coloração azul intensa, originada a partir da adsorção ou oclusão dos íons tri-iodeto nas moléculas de amido. Entretanto, o amido não pode ser usado em meio fortemente ácido, pois catalisa a quebra do amido pelo iodo (MELLO, 2015; HARRIS, 2005).

Na técnica espectrofotométrica, o complexo amido-tri-iodeto e o ânion tri-iodeto são medidos em diferentes comprimentos de onda do espectro eletromagnético. Enquanto o complexo amido-tri-iodeto, de coloração azul intensa, é medido na região do visível ($\lambda_{\text{máximo}} = 580 \text{ nm}$), o íon tri-iodeto, de coloração amarelo claro a castanho, é medido na região do ultravioleta ($\lambda_{\text{máximo}} = 288 \text{ nm}$ e 352 nm). Desta forma, a relação de proporcionalidade entre absorvância e concentração demonstrada pela Lei de Lambert-Beer

(Equação 1) permite a determinação do tri-iodeto complexado (FREITAS et al., 2011; HARRIS, 2005; PEREIRA et al., 2002).

$$A = \varepsilon \times b \times c \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

A = absorvância

ε = absortividade molar ($\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b = caminho óptico (cm)

c = concentração (mol L^{-1})

Alternativamente, a técnica titrimétrica pode ser empregada na determinação do tri-iodeto, realizando a sua titulação com uma solução padrão de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (Reação 4). A solução indicadora de amido deve ser adicionada próximo ao ponto estequiométrico da reação, pois se a solução de amido for adicionada quando a concentração de tri-iodeto for alta, este pode permanecer adsorvido no amido (MELLO, 2015; HARRIS, 2005), dificultando o desaparecimento da coloração azul e introduzindo um erro sistemático na análise.



A norma AOCS Ca 14-56 (2017) descreve a determinação de glicerol livre e total em óleos e gorduras, a partir da análise titrimétrica. O glicerol total é saponificado em solução alcoólica de KOH, para a liberação do glicerol ligado às cadeias graxas. O glicerol é extraído por partição, empregando mistura de ácido acético e clorofórmio e, em seguida, é oxidado com ácido periódico por 30 minutos, produzindo iodato. A adição posterior de iodeto produz o tri-iodeto (a partir do periodato em excesso e do iodato) que é titulado com tiosulfato de sódio, utilizando amido como indicador. Esta determinação assemelha-se, portanto, com a descrita pela ABNT (NBR 15771), exceto pela solução extratora empregada e pela matriz analisada e está sujeita aos mesmos inconvenientes.

Outro método fundamentado na titrimetria e baseado na oxidação do glicerol com periodato é o descrito pela norma AOAC 942.22 (1990) para a análise de cosméticos. Além da determinação de glicerol via ácido fórmico (relatada no tópico 2.4), a norma recomenda a determinação do glicerol através do periodato consumido, a partir da adição de bicarbonato de sódio, iodeto de potássio e 100 mL de água em ebulição sobre a solução extratora contendo o analito oxidado. A adição de bicarbonato de sódio foi realizada para prevenir a reação do iodeto com o iodato, devido ao pH do meio (entre 7 e 8) (BURGOT, 2012). Assim, o tri-iodeto produzido é apenas proveniente da reação entre o periodato e iodeto. O tri-iodeto é então titulado contra As_2O_3 $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, na presença de amido, até o desaparecimento da coloração azul. O periodato consumido na reação de oxidação do glicerol é determinado pela diferença entre os volumes gastos de titulante nas titulações da amostra e do branco. Contudo, este método apresenta desvantagens como longo tempo de análise, especialmente na oxidação do glicerol (1 hora), além do uso de substâncias tóxicas, como o As_2O_3 utilizado na titulação e o clorofórmio empregado na extração.

Alguns autores utilizaram a iodometria para determinação simultânea de iodato e periodato presentes em matrizes aquosas. Afkhami e Zarei (2001) utilizaram a reação de iodato com iodeto (Reação de Dushman) e do periodato e com o iodeto, ambas em meio ácido. À mistura foi adicionado azul de metileno para complexar o ânion tri-iodeto formado, permitindo o monitoramento do desaparecimento do azul de metileno, pela diminuição da absorvância em 665 nm. Os autores observaram que a diminuição da absorvância se estendeu por até 180 s após o início da reação do iodato e do periodato com iodeto. A diferenciação da

determinação dos íons foi realizada empregando procedimentos com condições diferenciadas de acidez e de concentração de iodeto.

Ensafi e Dehagui (2000) propuseram um método de injeção em fluxo para a determinação simultânea de íons periodato e iodato em amostras de água doce. Neste método, o periodato e o iodato reagem com o iodeto formando tri-iodeto, que é determinado por espectrofotometria, em 349 nm. Simultaneamente, em outra corrente de amostra, apenas o periodato é determinado, pois ele provoca a oxidação do azul de alizarina, produzindo um composto fluorescente determinado por espectrofluorimetria, em 516 nm. Os limites de detecção encontrados foram de 0,75 mg L⁻¹ e 0,21 mg L⁻¹ para o periodato e iodato, respectivamente.

Outro método que determinou o periodato e iodato em água doce pela Reação de Dushman foi proposto por Ensafi e Chamjangali (2003). Os autores relataram a reação dos íons com iodeto, em pH 3,5, produzindo o tri-iodeto, que foi determinado por espectrofotometria a 352 nm. No sistema de injeção em fluxo utilizado, a primeira injeção foi feita para a determinação de iodato, pela mistura de três correntes, cada uma contendo: solução da amostra, solução de molibdato (tamponada em pH 3,5) para mascaramento do periodato e solução de iodeto. A segunda injeção consistia na determinação do periodato e do iodato, pela mistura de correntes de amostra, de tampão pH 3,5 sem molibdato e solução de iodeto. Os limites de detecção foram de 0,040 e 0,050 mg L⁻¹ para o periodato e iodato, respectivamente.

De maneira geral, as metodologias relatadas para a determinação do glicerol livre a partir de sua oxidação com periodato empregam uma série de etapas e um elevado tempo de análise, quando baseadas na formação do iodato e do ácido fórmico (Figura 1). A determinação espectrofotométrica via aldeído fórmico, por outro lado, possui desvantagem quanto aos cuidados relacionados ao uso do reagente acetilacetona, de caráter tóxico e de baixa estabilidade.

Nas determinações titrimétricas do glicerol via ácido fórmico e iodato, o alto tempo de análise se dá devido à baixa concentração do periodato empregado na oxidação do glicerol. No primeiro caso (via ácido fórmico), essa baixa concentração se deve à interferência do excesso de periodato, que deve ser eliminado com um α -glicol, como o propilenoglicol. O segundo caso (via iodato) envolve o uso da titulação iodométrica, o que garante uma maior especificidade e resposta ao método. Contudo, o periodato em excesso reage de modo semelhante ao iodato, nas condições empregadas e, portanto, uma pequena quantidade de periodato deve ser utilizada para obter uma maior diferença entre os volumes de titulante gasto no branco e na amostra. Em contrapartida, a diminuição da quantidade de periodato aumenta o tempo requerido para a oxidação do glicerol.

Portanto, este trabalho propõe uma nova abordagem para a determinação do teor de glicerol livre no biodiesel, a partir do iodato produzido na oxidação do glicerol desenvolvida por Malaprade (1928). Tal abordagem se baseia na utilização de excesso de periodato na oxidação do glicerol, para diminuir o tempo requerido nesta etapa, aliada à eliminação da interferência do periodato não reagido, realizando o seu mascaramento com o molibdato. Neste estudo, o mascaramento do periodato em meio aquoso contendo periodato e iodato é baseado nos experimentos de Belcher e Townshend (1968), Nakashima e colaboradores (1999) e Ensafi e Chamjangali (2003), de modo a estabelecer uma medida analítica diretamente relacionada apenas à quantidade do iodato produzido e, por sua vez, do glicerol. Sequencialmente, a reação proposta por Dushman (1904) entre o iodato e o iodeto é utilizada para proporcionar a determinação iodométrica do tri-iodeto produzido. Assim, este trabalho tem como contribuição científica, simplificar, acelerar e melhorar a sensibilidade da determinação do glicerol livre em biodiesel proporcionada pelo mascaramento do periodato remanescente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Propor metodologias simples, rápidas e de baixo custo para a determinação do teor de glicerol livre em biodiesel, a partir do iodato produzido na oxidação do glicerol com o periodato e mascaramento do periodato excedente com o molibdato.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e purificar os biodieseis metílicos de soja, palmiste, macaúba e fritura;
- Avaliar o perfil químico dos biodieseis produzidos através do uso da técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H);
- Propor condições reacionais para oxidação rápida e quantitativa do glicerol com periodato e mascaramento efetivo do periodato com molibdato;
- Determinar o teor de glicerol livre nos biodieseis por medidas espectrofotométricas;
- Determinar o teor de glicerol livre em padrões aquosos e nos biodieseis por medidas titrimétricas;
- Avaliar estatisticamente as metodologias propostas.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes

Neste trabalho, foram utilizados os reagentes abaixo listados:

- ❖ Óleo de soja comercial, Soya[®], Rio de Janeiro, Brasil;
- ❖ Óleo bruto de palmiste, Agropalma, Belém, Pará, Brasil;
- ❖ Óleo de macaúba (polpa), Associação de pequenos produtores de Riacho Dantas, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil;
- ❖ Óleo de fritura usado, UFRRJ, *campus* Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil;
- ❖ Resina de ácido sulfônico Amberlite BD10[®];
- ❖ Iodato de potássio, pureza $\geq 99,4$ % m/m, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil;
- ❖ Periodato de sódio, pureza $\geq 99,0$ % m/m, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil;
- ❖ Ácido acético, pureza $\geq 99,5$ % m/m, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil;
- ❖ Molibdato de sódio $\geq 99,0$ % m/m, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil;
- ❖ Metóxido de sódio, pureza 30% m/m em metanol, Sigma Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil;
- ❖ Glicerol, pureza $\geq 99,5$ % m/m, Sigma Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil;
- ❖ Metanol, pureza $\geq 99,0$ % m/m, Proquímios, Rio de Janeiro, Brasil;
- ❖ n-heptano, pureza $\geq 99,0$ % m/m, Isofar, Rio de Janeiro, Brasil;
- ❖ Tiosulfato de sódio, pureza $\geq 99,5$ % m/m, Impex, Minas Gerais, Brasil;
- ❖ Iodeto de potássio, pureza $\geq 99,0$ % m/m, Êxodo Científica, São Paulo, Brasil;
- ❖ Amido solúvel, Cinética Reagentes e Soluções, São Paulo, Brasil.

4.2 Instrumentação

A secagem dos biodieseis foi realizada em estufa (FANEM, modelo 515, BRASIL). A caracterização dos biodieseis sintetizados foi realizada em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) de 500 MHz, modelo Ultrashield 500 plus, Bruker (Billerica, USA). Uma centrífuga (ASTRAL CIENTÍFICA, modelo EEQ9004A, BRASIL) foi utilizada para facilitar a separação do glicerol - biodiesel.

A medição do pH das soluções preparadas foi realizada mediante o uso de um medidor de pH portátil (KASVI, BRASIL).

Para as medidas espectrofotométricas no UV-Vis foram utilizados: espectrofotômetro de feixe único, da marca KASUAKI, modelo IL-592-BI, JAPÃO e espectrofotômetro de feixe duplo, da marca Shimadzu, modelo UV-1800, JAPÃO. Para as leituras foram utilizadas cubetas de quartzo com o caminho ótico de 1 cm.

Para as medidas titrimétricas foram empregadas buretas, como instrumento de precisão, de 5,00 ($\pm 0,01$) mL e de 50,00 ($\pm 0,05$) mL.

As micropipetas utilizadas na transferência das alíquotas apresentaram volumes variáveis de 100 – 1000 (± 2) μ L, 100 – 1000 (± 5) μ L e 1,0 – 5,0 ($\pm 0,1$) mL.

4.3 Síntese, Purificação e Caracterização do Biodiesel

A síntese dos biodieseis foi precedida pela determinação dos índices de acidez dos óleos empregados, com o intuito de avaliar a necessidade da realização de esterificação dos ácidos graxos livres (AGLs). O índice de acidez corresponde à massa de álcali (KOH ou NaOH), em mg, necessária para neutralizar os ácidos graxos livres em 1 g de gordura. A esterificação é normalmente utilizada quando a matéria-prima apresenta índice de acidez

elevado, que pode ocasionar a formação de sabões na transesterificação quando se utiliza um catalisador básico, diminuindo, assim, o rendimento da reação (ZHANG et al., 2003; MA & HANNA, 1999). Segundo da Silva e Neto (2013), este pré-tratamento é recomendado em óleos com índices de acidez maiores que $3 \text{ mg g}^{-1} \text{ NaOH}$.

A determinação do índice de acidez foi realizada mediante a solubilização, em erlenmeyer, de 1,0 mL de óleo em 9,0 mL de álcool isopropílico e adição de 3-4 gotas de fenolftaleína 0,1% m/v. A mistura foi titulada com NaOH $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Nesta determinação, buscou-se apenas estimar o índice de acidez aproximado, não tendo sido empregadas medidas de alta precisão na tomada da amostra analisada e nem foi realizada a padronização da solução de NaOH. Os erros experimentais, nesta etapa, não acarretariam prejuízos à proposta de estudo deste trabalho. As amostras de óleo com índice de acidez superiores a $3 \text{ mg g}^{-1} \text{ NaOH}$ (3,0 mL de titulante) foram submetidos à esterificação, conforme procedimento descrito por Silva e colaboradores (2018).

A reação de esterificação foi realizada adicionando 600,0 g de óleo, 6,0 g de ácido sulfúrico concentrado e 144,0 g de metanol em balão de fundo redondo de capacidade de 1,0 L. A mistura foi mantida em banho-maria, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação magnética vigorosa, durante 1 hora. Em seguida, a mistura obtida foi transferida para um funil de separação, havendo a formação de duas fases: a fase oleosa, mais densa; e a fase metanólica, menos densa. Ocasionalmente, foi observada a formação de três fases: a do glicerol, mais densa; a oleosa, de densidade intermediária; e a metanólica, de menor densidade. Após este procedimento, foi realizada a titulação da fase oleosa para verificar se o índice de acidez se tornou inferior a $3 \text{ mg g}^{-1} \text{ NaOH}$. Nos casos onde os índices foram superiores a este valor, a reação de esterificação foi realizada novamente.

A reação de transesterificação foi efetuada adicionando 600,0 g de óleo, 96,0 g de metanol e 3,5 g de solução metanólica de metóxido de sódio 30% m/m em balão de fundo redondo, de capacidade de 1,0 L. A mistura resultante foi mantida em banho-maria, a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, por 1 hora, sob agitação magnética vigorosa. Após, a mistura obtida foi transferida para um funil de separação e deixada em repouso por 30 minutos. A fase do glicerol (mais densa) foi removida do funil de separação. A fase menos densa, e rica em biodiesel, foi submetida a uma nova etapa de transesterificação, para aumentar a conversão da matéria-prima a metil ésteres. Para tal, foram adicionados 24,0 g de metanol e 0,9 g de solução metanólica de metóxido de sódio 30% m/m à fase menos densa. Esta mistura foi mantida a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação magnética vigorosa por 1 hora. A mistura foi transferida para um funil de separação, e a glicerina foi removida. Posteriormente, a fase rica em biodiesel (menos densa) foi seca em estufa, a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, por 2 horas e, finalmente, percolada em uma coluna contendo resina Amberlite BD10[®]. O processo foi repetido utilizando um novo recheio de resina Amberlite BD10[®], previamente seca a $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1, RMN ¹H foi utilizada para caracterizar os biodieseis produzidos e avaliar a conversão dos triglicerídeos. Uma amostra de óleo de soja foi analisada pela técnica de RMN ¹H. Para tal, foram utilizadas massas de 10 mg das amostras que foram dissolvidas em 300 μL de clorofórmio deuterado (CDCl_3). As soluções foram analisadas empregando um campo magnético de 500 MHz, larguras espectrais de 20,66 ppm, 128 varreduras e temperatura de 300,0 K.

4.4 Preparo das Soluções

O preparo das soluções foi realizado de acordo com os procedimentos descritos a seguir:

Solução de periodato de sódio (NaIO_4) 5,0 mmol L⁻¹, em tampão pH 5,5: Inicialmente, foi preparada uma solução de ácido acético (CH_3COOH) 1,6 mol L⁻¹ a partir da diluição de 25,0 mL de ácido acético glacial em água deionizada até completar 250,0 mL. Em seguida, foi preparada uma solução de acetato de amônio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 4,0 mol L⁻¹ pela dissolução de 77,0 g de acetato de amônio em água deionizada, até completar 250,0 mL de solução. Após, estas soluções foram misturadas na proporção 1:1 (v/v) (tampão acetato de amônio 2,8 mol L⁻¹). Uma massa de 0,050 g de NaIO_4 foi dissolvida, com o auxílio de um banho ultrassônico, para facilitar a solubilização, a fim de preparar 50,00 mL de solução. A solução preparada foi mantida em recipiente e local protegido da luz.

Solução aquosa de NaIO_4 5,0 mmol L⁻¹: Uma massa de 0,050 g de NaIO_4 foi dissolvida em água deionizada, transferida para um balão volumétrico de 50,00 mL e completando o volume com água deionizada. Esta solução foi mantida em recipiente e local protegido da luz.

Solução de CH_3COOH 2,8 mol L⁻¹, em pH 3,0: Um volume de 160,0 mL de ácido acético glacial foi diluído a 1,0 L com água deionizada. O pH foi ajustado com solução de NaOH 1 mol L⁻¹, com auxílio de um medidor de pH portátil.

Solução de molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,20 mol L⁻¹: A solução de molibdato de sódio foi preparada pela dissolução de 12,1 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em água deionizada o suficiente para o preparo de 250,00 mL de solução.

Solução de iodeto de potássio (KI) 2,0% m/v: Uma massa de 4,0 g de KI foi solubilizada em água deionizada e diluída até completar o volume de 200,00 mL, em um balão volumétrico.

Solução aquosa de amido 1,0% m/v: Esta solução foi preparada a partir da dissolução de 1,0 g de amido solúvel em 50,0 mL de água deionizada. Após, foi realizado o aquecimento da solução até fervura e, a seguir, foram adicionados 50,0 mL de água deionizada, sob agitação. Esta solução foi preparada no mesmo dia de cada análise realizada.

Solução indicadora de amido 1,0% m/v (em glicerol:água 1:1): A goma de amido foi preparada a partir da dissolução de 1,0 g de amido solúvel em 50,0 mL de água deionizada fria. Após, foi realizado o aquecimento da solução até fervura e, a seguir, foram adicionados 50,0 mL de glicerol, sob agitação. A mistura foi mantida em placa de aquecimento por cerca de 10 minutos. A mesma solução foi utilizada para os distintos dias de análises realizadas.

Solução estoque de iodato de potássio (KIO_3) 100,00 mmol L⁻¹: Esta solução estoque foi preparada a partir da solubilização de 2,1411 g de KIO_3 que foi quantitativamente transferido para um balão volumétrico de 100,00 mL, sendo o volume do balão completado com água deionizada.

Solução estoque de glicerol 10.000 mg L⁻¹: A solução estoque de glicerol 10.000 mg L⁻¹ foi preparada em água, a partir da pesagem de 0,5 ($\pm 0,0001$) g de glicerol e transferência quantitativa para um balão volumétrico de 50,00 mL.

Solução estoque de glicerol 5.000 mg L⁻¹: A solução estoque de glicerol 5.000 mg L⁻¹ foi preparada pela dissolução de 0,5 ($\pm 0,0001$) g de glicerol e posterior diluição com água deionizada, em balão volumétrico de 100,00 mL.

Solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) $0,005 \text{ mol L}^{-1}$: uma massa de 2,5 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ foi solubilizada em 2000,0 mL de água deionizada.

Solução de padrão de iodato de potássio (KIO_3) $1,000 \text{ mmol L}^{-1}$: 0,2140 g de KIO_3 foram dissolvidos em 1000,0 mL de água deionizada.

Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) $3,0 \text{ mol L}^{-1}$: 33,0 mL de ácido sulfúrico concentrado foram diluídos em balão volumétrico de 200,0 mL, contendo água deionizada.

Solução de KI 1,0% m/v: Uma massa de 1,0 g de KI foi solubilizada em água deionizada e diluída até completar o volume de 100,00 mL, em um balão volumétrico.

4.5 Determinação do Teor de Glicerol Livre por Espectrofotometria

4.5.1 Preparo das soluções analíticas

A partir da solução estoque de KIO_3 $100,00 \text{ mmol L}^{-1}$ foram feitas soluções-padrão de iodato nas concentrações de 0,200, 0,400, 0,600, 0,800, 1,00, 1,20 e 1,40 mmol L^{-1} , em balão volumétrico de 50,00 mL. A água deionizada utilizada no preparo dos padrões foi armazenada em um frasco para ser utilizado como o branco da análise.

Soluções-padrão de glicerol foram preparadas, em triplicata, nas concentrações 10,0, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0 e 70,0 mg L^{-1} , por meio da diluição da solução estoque de glicerol 10.000 mg L^{-1} , em um balão volumétrico de 100,00 mL. A água deionizada foi utilizada como branco.

4.5.2 Avaliação da proporção dos reagentes empregados na análise

Espectros no UV-Vis foram obtidos com os padrões de iodato de concentração 0,200 a 1,40 mmol L^{-1} , para avaliar se a proporção dos reagentes empregada seria suficiente para complexar o ânion periodato, e permitir uma variação do sinal analítico adequada, para quantificar o ânion iodato obtido na oxidação do glicerol. Para tal, 100 μL de cada padrão de iodato foram adicionados em tubos de ensaio distintos, de capacidade de 10 mL, e misturados com 300 μL de solução NaIO_4 $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, preparada em solução tampão de pH 5,5. Após agitação, foram acrescentados 2800 μL de solução de ácido acético $2,8 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) e 300 μL de molibdato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (para a complexação do periodato). A mistura foi agitada por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 300 μL de KI 2,0% m/v e 1,00 mL de solução aquosa de amido 1,0% m/v.

Uma alíquota de 250 μL da solução produzida foi transferida para uma cubeta de quartzo (de caminho óptico de 1 cm) e misturada com 2,75 mL de solução de ácido acético pH 3,0. Finalmente, foi realizada a obtenção dos espectros UV-Vis no espectrofotômetro de feixe duplo (300 a 800 nm), para a avaliação proposta e obtenção do comprimento de onda de máxima absorção do complexo amido-tri-iodeto. Este procedimento experimental foi feito para cada padrão de iodato e foi repetido realizando a substituição do padrão de iodato por água deionizada (branco).

4.5.3 Construção da curva analítica

Em tubos de ensaios distintos, foram adicionados 100 μL de padrões de glicerol (preparados em triplicata) de concentração de 10,0 a 70,0 mg L^{-1} . A seguir, foram adicionados 300 μL de solução NaIO_4 $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (preparado em solução tampão de pH 5,5). Após

agitação vigorosa por 2 minutos (para oxidar o glicerol), foram acrescentados 2800 µL de solução de ácido acético 2,8 mol L⁻¹ (pH 3,0) e 300 µL de molibdato de sódio 0,2 mol L⁻¹ (para a complexação do periodato remanescente). Agitou-se a mistura por 1 minuto e, a seguir, adicionou-se 300 µL de KI 2,0% m/v e 1,00 mL de solução aquosa de amido 1,0% m/v. Uma alíquota de 250 µL desta mistura foi transferida para uma cubeta de quartzo (de caminho óptico de 1 cm) e misturada com 2,75 mL de solução de ácido acético pH 3,0. Finalmente, foram realizadas as leituras das absorvâncias em 582 nm.

Foram utilizados dois espectrômetros nas leituras a fim de avaliar a robustez do método proposto, devido às diferenças entre o funcionamento dos equipamentos e seus custos financeiros. A água deionizada foi utilizada para a correção da linha de base e como referência no espectrofotômetro de feixe duplo. No de feixe único, de maior simplicidade e menor custo, a absorvância foi zerada com água deionizada.

As leituras das soluções preparadas com padrões de glicerol e do branco foram realizadas em espectrofotômetro de feixe duplo, em apenas um dia de análise, e no de feixe único, as análises foram feitas de maneira independente, em três dias distintos. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de absorção máxima, em 582 nm.

Foram analisadas 10 amostras do branco (água deionizada), em espectrofotômetro de feixe único para a determinação dos limites de detecção (*LD*) e quantificação (*LQ*) do método, conforme Equações 2 e 3, respectivamente.

$$LD = \frac{3,3 \times s_b}{a} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = \frac{10 \times s_b}{a} \quad (\text{Equação 3})$$

onde:

LD = limite de detecção;

LQ = limite de quantificação;

s_b = desvio padrão das medidas de absorvância de 10 amostras do branco;

a = coeficiente angular da curva analítica.

4.5.4 Determinação do teor de glicerol livre nos biodieseis

A determinação do teor de glicerol nas amostras de biodiesel foi realizada mediante a extração do glicerol por uma mistura de etanol-água (1:1 v/v) e n-heptano (para separar o biodiesel). Para tal, foi realizada a adição de 800 µL de etanol, 800 µL de água e 1600 µL de n-heptano a uma massa referente a 400 µL do biodiesel. A mistura foi levada à centrifugação a 2000 rpm por 1 minuto.

Uma alíquota de 100 µL da fase etanol-água (fase inferior) foi transferida para um tubo de ensaio e analisada conforme o procedimento adotado para os padrões de glicerol, na construção da curva analítica. Contudo, ao final do procedimento, a alíquota transferida para a cubeta foi de 150 µL (em vez de 250 µL), que sofreu adição de 2,85 mL (ao invés de 2,75 mL) de solução de ácido acético pH 3,0. Esta modificação foi necessária para que as absorvâncias lidas fossem mantidas dentro da faixa linear da curva.

Nesta etapa, as leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro de feixe único em 582 nm. As análises foram realizadas em 5 réplicas e em três dias diferentes, para avaliar a precisão intermediária do método.

4.6 Determinação do Teor de Glicerol Livre por Titrimetria

4.6.1 Preparo das soluções analíticas

Para o preparo das soluções analíticas, os balões volumétricos utilizados foram calibrados, levando-se em conta a expansão volumétrica da água e das vidrarias com a temperatura, para a eliminação de erros sistemáticos e garantia da confiabilidade dos resultados. Utilizando-se micropipeta automática de 100 a 1000 ($\pm 2 \mu\text{L}$) foram preparados padrões de glicerol nas concentrações nominais de 10,0, 20,0, 30,0, 40,0 e 50,0 mg L^{-1} , em um balão volumétrico de 100,00 mL, a partir da solução estoque de glicerol 5.000 mg L^{-1} .

4.6.2 Padronização de solução de tiosulfato de sódio 0,005 mol L^{-1}

Um volume de 10,00 mL de solução padrão primário de KIO_3 1,000 mmol L^{-1} foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL, com o auxílio de uma pipeta volumétrica. Após, o meio foi acidificado com 1,0 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 3,0 mol L^{-1} e sofreu o acréscimo de 5,0 mL de KI 1,0 % m/v. A mistura foi titulada contra solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,005 mol L^{-1} até coloração amarelo claro, empregando bureta de 50,00 ($\pm 0,05$) mL. A seguir, foram adicionadas 3 - 4 gotas de solução de amido 1,0 % m/v (em glicerol: água 1:1) (solução azul). A mistura foi titulada até o desaparecimento da coloração azul. A padronização foi realizada em triplicata.

4.6.3 Determinação do glicerol em padrões aquosos

Alíquotas de 1000 μL dos padrões de glicerol foram transferidas, com auxílio de uma micropipeta, para tubos de ensaio com tampa rosqueada, de capacidade de 10 mL. Aos padrões foram adicionados 1000 μL de solução aquosa de NaIO_4 5,0 mmol L^{-1} . Esta mistura foi agitada vigorosamente por 3 minutos. Após, foi realizada a transferência quantitativa da solução obtida para um erlenmeyer de 250 mL, utilizando 10,0 mL de solução de ácido acético 2,8 mol L^{-1} , pH 3,0. A seguir, 3,00 mL de solução de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mol L^{-1} foram adicionados ao erlenmeyer. Agitou-se vigorosamente até o aparecimento de coloração amarelo claro, característico da formação do complexo ($[\text{I}(\text{MoO}_4)_6]^{5-}$) e, posteriormente, foram acrescentados 2,00 mL de KI 2,0% m/v.

A mistura foi titulada com uma solução padrão de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,005 ($\pm 0,000002$) mol L^{-1} , empregando bureta de 5,00 ($\pm 0,01$) mL, até cor amarelo claro. Adicionou-se 2 gotas de solução indicadora de amido 1,0% m/v (em glicerol: água 1:1), para a formação de complexo amido-tri-iodeto, de coloração azul intensa, e prosseguiu-se a titulação até o desaparecimento desta coloração azul. O procedimento de titulação dos padrões foi efetuado em seis réplicas, assim como a titulação do branco. O branco empregado foi a água deionizada, de mesma origem que a utilizada no preparo dos padrões de glicerol.

Foi construída uma curva de resposta de volume *versus* concentração dos padrões de glicerol, para a avaliação das figuras de mérito da metodologia. Os limites de detecção (*LD*) e quantificação (*LQ*) foram calculados com base na análise de 8 soluções-branco, conforme as equações 2 e 3, anteriormente descritas.

4.6.4 Determinação do teor de glicerol livre nos biodiéseis

Para a determinação do teor de glicerol livre, foi realizada a transferência de 400 μL dos biodiéseis sintetizados para tubos de ensaio com tampas rosqueadas, de 10 mL de

capacidade. A massa de amostra correspondente foi determinada em balança analítica ($\pm 0,0001$) g.

A extração do glicerol livre presente no biodiesel foi realizada fazendo a adição de 1600 μL de água deionizada e 1600 μL de n-heptano, nos tubos contendo a amostra. Esta mistura foi agitada vigorosamente por 1 minuto e, depois, submetida à centrifugação a 2000 rpm durante 1 minuto, para a separação da fase aquosa (contendo o glicerol) e da fase orgânica (contendo o biodiesel).

A seguir, 1000 μL da fase aquosa foram transferidos para um tubo de ensaio de vidro, com tampa rosqueada, com capacidade para 10 mL de solução. A este volume, foram adicionados 1000 μL de solução aquosa de NaIO_4 5,0 mmol L^{-1} . Esta mistura foi agitada vigorosamente durante 3 minutos e transferida quantitativamente para erlenmeyer de 250 mL, lavando-se as paredes do tubo com pequenas alíquotas de solução de ácido acético 2,8 mol L^{-1} (pH 3,0), totalizando 10,0 mL de solução de ácido acético. Ao erlenmeyer foram adicionados 3,00 mL de solução de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mol L^{-1} e, novamente, a mistura foi agitada vigorosamente, até o aparecimento de coloração amarelo claro. Após, foram acrescentados 2,00 mL de KI 2,0% m/v.

A mistura foi titulada com uma solução padrão de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,005 ($\pm 0,000002$) mol L^{-1} , empregando bureta de 5,00 ($\pm 0,01$) mL até cor amarelo claro. Adicionou-se 2 gotas de solução indicadora de amido 1,0% m/v (em glicerol: água 1:1), para a formação de complexo amido-tri-iodeto, de coloração azul intensa, e prosseguiu-se a titulação até o desaparecimento desta coloração azul.

Os brancos utilizados nesta determinação foram 1000 μL da fase aquosa da solução extratora (1600 μL de água deionizada e 1600 μL de n-heptano), sem o biodiesel. O procedimento de extração e análise foram realizados em cinco réplicas. A análise dos diferentes tipos de biodieseis foi realizada em três dias distintos de forma independente, para avaliar a precisão intermediária do método.

4.6.5 Ensaio de recuperação do glicerol livre em biodiesel

Os ensaios de recuperação do glicerol foram realizados mediante a fortificação de 100 μL das amostras de biodiesel (pesadas em balança analítica) com 100 μL de padrões de glicerol, em 3 níveis de concentração: 250, 500 e 1000 mg L^{-1} , a partir de solução estoque de glicerol 5.000 mg L^{-1} . A extração e a determinação do teor de glicerol livre foram realizadas conforme procedimento adotado na análise das amostras de biodiesel sem a fortificação. A avaliação da recuperação foi realizada em cinco réplicas.

4.7 Tratamento Estatístico

A identificação de dados discrepantes foi realizada após avaliação estatística empregando o teste de Grubbs (G). A comparação dos resultados foi realizada empregando os testes t de Student e análise de variância (ANOVA). Para estes testes, foi utilizado um limite de significância estatística ao nível de confiança (NC) de 95 %. O tratamento estatístico foi realizado no programa *Excel for Microsoft Windows*® 2010.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese, Purificação e Caracterização do Biodiesel

A análise dos índices de acidez dos óleos vegetais revelou que o óleo de soja apresentou índice de acidez inferior a $3 \text{ mg g}^{-1} \text{ NaOH}$ ($0,20 \text{ mg g}^{-1}$) e, portanto, este óleo não foi submetido à etapa de esterificação. Neste caso, foram realizadas apenas as etapas de transesterificação.

Os óleos de palmiste, macaúba (polpa) e fritura apresentaram índices de acidez elevados ($3,1 \text{ mg g}^{-1}$, 60 mg g^{-1} e $6 \text{ mg g}^{-1} \text{ NaOH}$, respectivamente) e, portanto, foram submetidos à esterificação até índices de acidez inferiores a $3 \text{ mg g}^{-1} \text{ NaOH}$. Após atender à esta condição, estes óleos foram submetidos à reação de transesterificação.

A reação de esterificação diminui a acidez dos óleos, em razão da diminuição da presença de ácidos graxos livres no meio. Na reação de esterificação, os ácidos carboxílicos presentes nos óleos, reagem com o álcool metílico, na presença do catalisador ácido sulfúrico, produzindo ésteres metílicos (Figura 5).

Após reação de transesterificação, observou-se a formação de duas fases distintas nas quais estão distribuídos os produtos de reação, excesso de reagentes e impurezas. O glicerol, em sua maior parte, fica distribuído na fase inferior, enquanto o biodiesel se encontra, predominantemente, na fase superior (Figura 8).



Figura 8. Separação das fases do glicerol (mais densa) e do biodiesel (menos densa) após transesterificação do óleo de soja

Os triglicerídeos dos óleos utilizados na síntese dos biodieseis analisados apresentam distintas composições. A Tabela 3 apresenta a composição dos biodieseis de soja, palmiste e macaúba (polpa). Segundo a literatura, os óleos de soja e macaúba apresentam alto índice de insaturação, devido ao teor de ácido linoleico (C18:2) e oleico (C18:1), respectivamente. Por outro lado, o óleo de palmiste apresenta baixo índice de insaturação, enquanto o óleo de fritura apresenta composição variável (ROCHA Jr. et al., 2019; AMARAL et al., 2011).

Tabela 3. Composição percentual de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) no biodiesel de soja, palmiste e macaúba (polpa)

FAME	Soja	Palmiste	Macaúba (polpa)
C8: 0	-	3,34	-
C10: 0	-	3,14	-
C12: 0	-	36,52	1,56
C14: 0	-	11,03	0,49
C16: 0	10,98	8,8	12,18
C16: 1	0,09	0,08	1,36
C17: 0	0,09	0,03	-
C17: 1	0,05	0,02	-
C18: 0	3,27	3,75	2,64
C18: 1	23,33	29,68	71,54
C18: 2	54,78	3,37	6,77
C18: 3	6,57	-	-
C20: 0	0,3	0,13	1,77
C20: 1	0,19	0,11	-
C22: 0	0,34	-	1,69

Fonte: ROCHA Jr. et al., 2019; AMARAL et al., 2011.

A caracterização dos biodieseis e a determinação da conversão dos triglicerídeos à biodiesel foram realizadas pela técnica de RMN ¹H. O óleo de soja foi analisado para comparar o seu espectro com o produto obtido após a reação de transesterificação. Assim, os espectros de RMN ¹H do óleo de soja e do produto formado após a reação de transesterificação deste óleo estão representados na Figura 9. Nesta Figura, são ilustradas as fórmulas estruturais do triglicerídeo predominante no óleo de soja, e o principal metil éster formado a partir deste óleo (C18: 2). A Figura 10 ilustra os espectros de RMN ¹H obtidos após a reação de transesterificação dos óleos de soja, palmiste, macaúba (polpa) e fritura.

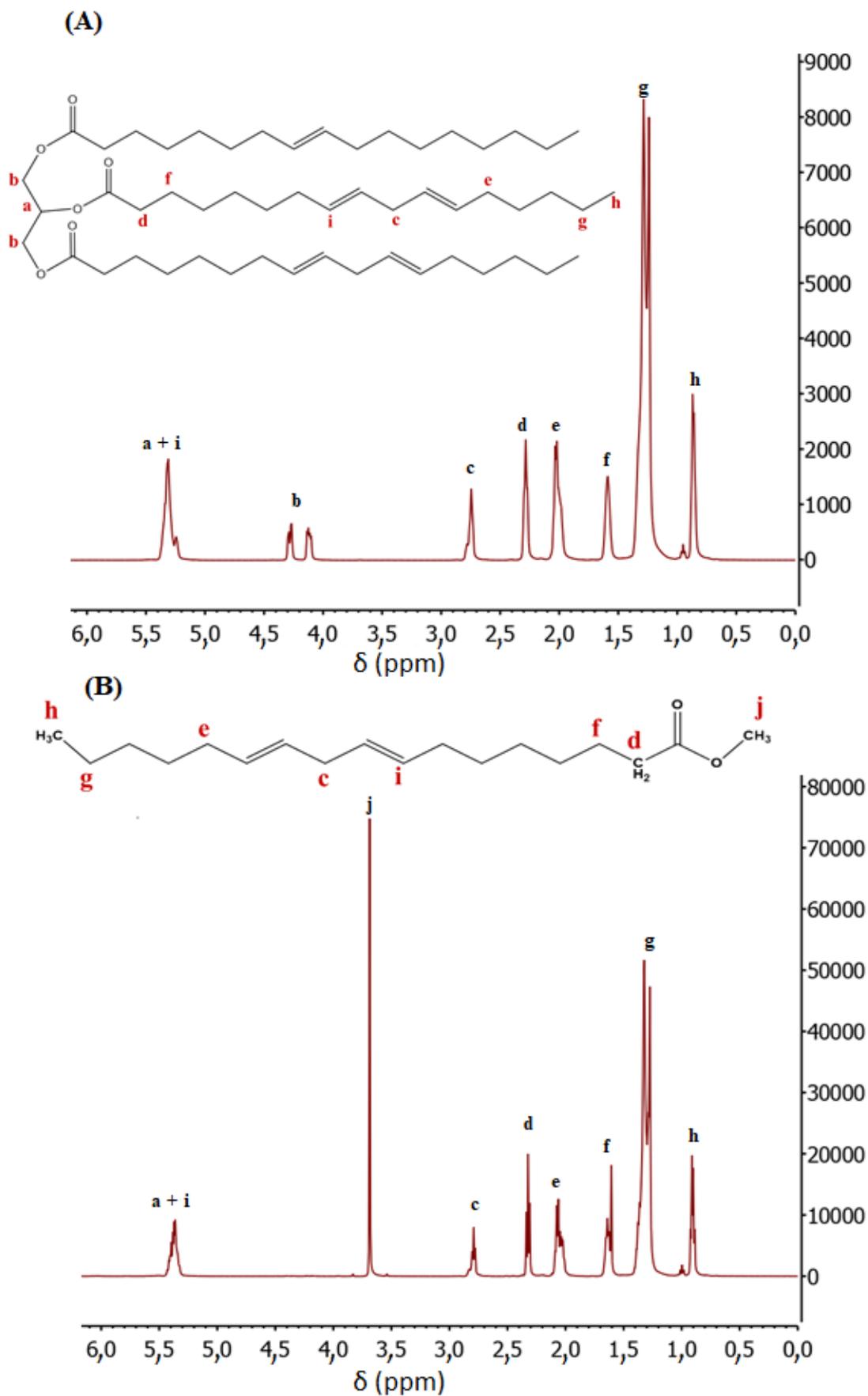


Figura 9. Espectros de RMN¹H do óleo de soja (A) e do biodiesel metílico de soja (B)

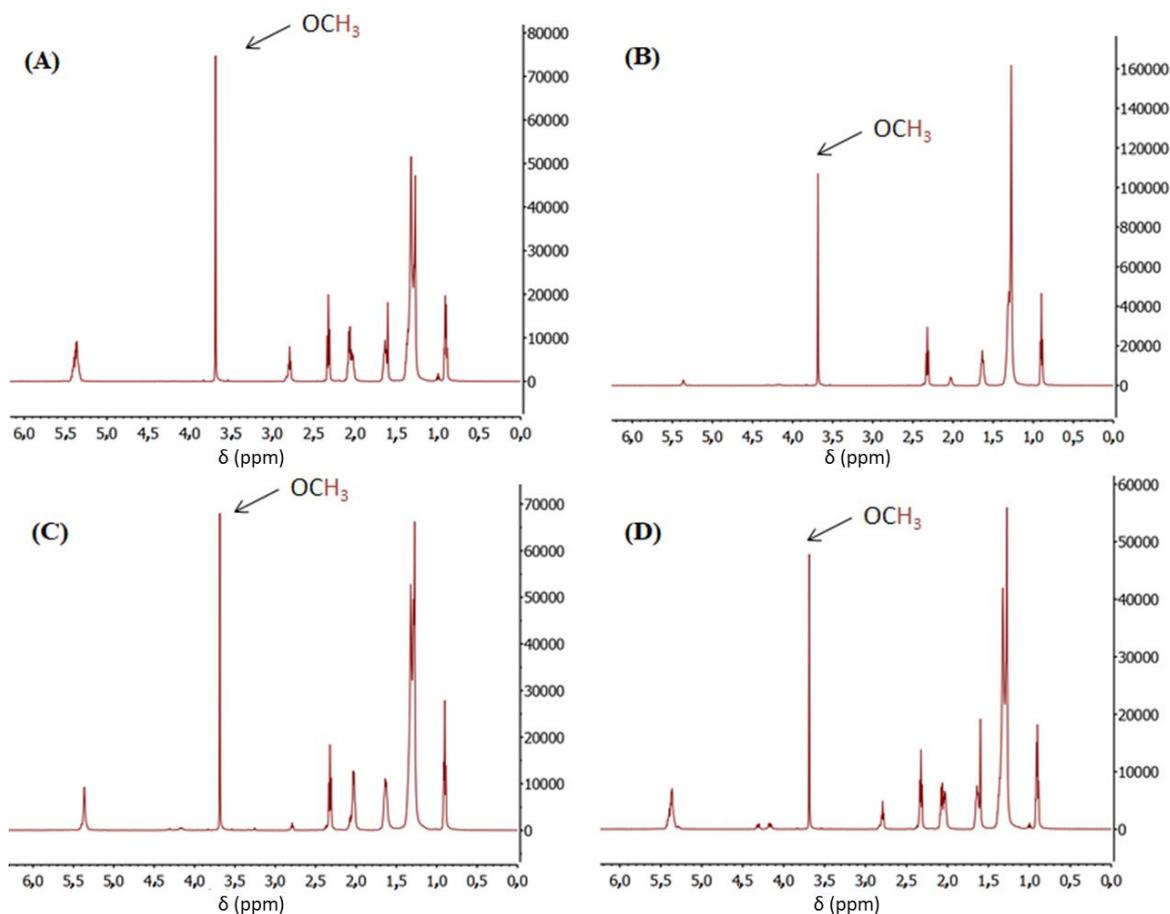


Figura 10. Espectros de RMN¹H dos biodieseis metílicos de soja (A), palmiste (B), macaúba (C) e fritura (D)

Os espectros de RMN ¹H do óleo de soja e do seu biodiesel metílico (Figura 9) exibiram sinais correspondentes aos hidrogênios olefínicos (i), alílicos internos (c), α -carboxílicos (d), alílicos externos (e), β - carboxílicos (f) e hidrogênios alifáticos (g/h) das cadeias graxas. Todos estes grupos foram mantidos após a reação de transesterificação do óleo de soja.

Além disso, os triglicerídeos podem ser identificados por um duplo dubleto com deslocamento químico entre δ 4,05-4,35 ppm, referente ao hidrogênio do grupo CH₂-O (b), e por um simpleto entre δ 5,2-5,3 ppm, correspondente ao hidrogênio do grupo CH-O (a) da porção glicerol (Figura 9A) (CORAL et al., 2013).

Assim, conforme relatado na literatura por Coral e colaboradores (2013), após a reação de transesterificação do óleo de soja, foi verificado o desaparecimento do pico correspondente ao hidrogênio do grupo CH₂-O (b), com deslocamento químico de δ 4,05-4,35 ppm (Figura 9B). Isto indica a ausência de resíduos de mono, di ou triglicerídeos, o que caracteriza a conversão dos glicerídeos à metil ésteres. Foi observado que o sinal entre δ 5,2-5,3 ppm não desapareceu após a reação de transesterificação (Figura 9B). Isto pode ser explicado pela presença de grupos insaturados HC=CH (i) na cadeia graxa do metil éster produzido (Tabela 3), que geram sinais nesta região e sobrepõem ao sinal referente ao hidrogênio do grupo CH-O (a) da porção glicerol.

A principal evidência observada entre os espectros do óleo de soja e do biodiesel metílico, que ratifica a conversão do triglicerídeo em metil éster, é o aparecimento de um

simpleto em δ 3,7 ppm, referente aos hidrogênios do grupo metoxila $-OCH_3$ (j) dos ésteres metílicos (CORAL et al., 2013). Este sinal foi observado nos espectros dos biodieseis de soja, palmiste, macaúba (polpa) e fritura (Figuras 9B e 10).

É possível notar, a ausência de sinais dos hidrogênios do grupo CH_2-O (b) (δ 4,05-4,35 ppm) nos biodieseis de soja e palmiste, porém estes sinais são exibidos pelos espectros dos biodieseis de macaúba (polpa) e fritura (Figura 10). Isto sugere que ocorreu uma maior conversão dos triglicerídeos presentes nos óleos de soja e palmiste, em comparação aos triglicerídeos dos óleos de macaúba (polpa) e fritura.

A porcentagem de conversão dos triglicerídeos à metil ésteres foi calculada a partir dos valores da integração (I) dos sinais em δ 3,7 ppm e δ 2,2-2,4 ppm (Tabela 4), correspondentes ao grupo metoxila e ao grupo metileno α -carboxílico do éster metílico, respectivamente, conforme Equação 4. Desta maneira, a integral do éster metílico deve ser dividida por 3, devido a presença de três hidrogênios ($-OCH_3$) em δ 3,7 ppm, e a integral do grupo metileno deve ser dividida por 2, uma vez que tem dois hidrogênios ($CH_2-C=O$) entre δ 2,2-2,4 ppm. Este último sinal foi utilizado no cálculo da conversão do óleo, pois está presente nos triglicerídeos e nos seus derivados (RUSCHEL et al., 2016; CORAL et al., 2013).

$$\% \text{ Conversão} = \frac{2 I_{3,7}}{3 I_{(2,2-2,4)}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

onde:

$I_{3,7}$ = valor da integral em δ 3,7 ppm;

$I_{(2,2-2,4)}$ = valor da integral em δ 2,2-2,4 ppm.

Tabela 4. Valor da integral dos sinais de RMN 1H dos biodieseis e porcentagem de conversão dos triglicerídeos à metil ésteres

Biodiesel	$I_{(4,05-4,35)}$	$I_{(5,2-5,3)}$	$I_{3,7}$	$I_{(2,2-2,4)}$	% Conversão
Soja	0,04	4,91	5,12	3,72	99,8
Palmiste	0,52	0,99	8,98	6,89	96,3
Macaúba	0,58	3,06	4,70	4,10	92,0
Fritura	0,59	2,84	2,49	2,55	88,7

Os valores de conversão foram satisfatórios para o biodiesel de soja e palmiste, próximos ao valor de teor de éster especificado pela ANP (96,5%). Isto demonstra que o procedimento de síntese e as condições de análise utilizadas foram eficientes para a produção destes biodieseis. Por outro lado, os biodieseis de macaúba (polpa) e fritura apresentaram menores valores de conversão. Estes biodieseis foram os originados dos óleos que apresentaram índices de acidez maiores, quando comparados aos óleos de soja e palmiste, o que pode ser um indício da menor eficiência no procedimento de síntese do biodiesel de macaúba (polpa) e fritura.

5.2 Determinação do Teor de Glicerol Livre por Espectrofotometria

5.2.1 Avaliação da proporção dos reagentes empregados na análise

Alguns autores estudaram o pH ótimo para a oxidação do glicerol com periodato (Figura 1), a partir de medidas espectrofotométricas baseadas na reação do aldeído fórmico com a acetilacetona (Figura 2) (LIMA et al., 2012; SILVA, 2011; BONDIOLI & BELLA, 2005). Tais autores encontraram melhores resultados na faixa de pH de 4,0 a 5,5. Por esta razão, a solução oxidante utilizada nesta metodologia (NaIO_4 5,0 mmol L^{-1}) foi preparada em tampão de pH 5,5.

A quantidade de molibdato empregada na análise foi baseada no experimento de Belcher e Townshend (1968), no qual realizaram a complexação do periodato presente em solução aquosa contendo iodato, de maneira rápida, efetiva e seletiva, na razão molar de 40:1 (molibdato:periodato).

Para avaliar se a quantidade de molibdato utilizada na metodologia espectrofotométrica proposta seria suficiente para a complexação do periodato remanescente, foi realizado um teste com padrões de iodato. Diante disso, 100 μL de padrão de iodato 0,200 mmol L^{-1} , 300 μL de solução NaIO_4 5,0 mmol L^{-1} (em solução tampão de pH 5,5), 2800 μL de solução de CH_3COOH 2,8 mol L^{-1} (pH 3,0), 300 μL de Na_2MoO_4 0,2 mol L^{-1} e 300 μL de KI 2,0% m/v foram adicionados em um tubo de ensaio, seguindo a sequência apresentada. A cada adição, foi realizada a agitação vigorosa da mistura. O procedimento foi repetido em outro tubo sem a adição da solução de Na_2MoO_4 0,2 mol L^{-1} , que foi substituída por água deionizada. Vale ressaltar que, nos dois tubos, foi empregado um excesso significativo de periodato em relação ao iodato.

No tubo sem o íon molibdato houve a formação de coloração castanha escura, devido à formação do íon tri-iodeto. Por outro lado, no tubo contendo molibdato foi observada coloração amarelo claro (Figura 11). Isto sugere que a quantidade de molibdato adicionado deve ser suficiente para mascarar o periodato presente na mistura, devido à diminuição da formação do íon tri-iodeto.



Figura 11. Efeito da adição do molibdato em mistura de iodato e periodato: (a) experimento com molibdato e (b) sem molibdato

A Figura 12 representa os espectros UV-Vis obtidos para os padrões de iodato de concentrações 0,200 a 1,40 mmol L^{-1} , mais o branco, empregando o espectrofotômetro de feixe duplo. A análise desta figura sugere que o periodato foi suficientemente mascarado pelo molibdato, permitindo uma variação de sinal apropriada entre os padrões de iodato, em 582 nm. Como o periodato está em excesso em relação ao iodato (de 75:7 a 75:1 em proporção molar) e ambos reagem com o iodeto, produzindo tri-iodeto, o efeito da variação da concentração do iodato no sinal seria desprezível e os espectros deveriam se sobrepor no caso de o periodato não complexar com o molibdato. Diante disso, esta metodologia se mostrou aceitável para ser empregada na construção da curva analítica para a determinação do glicerol.

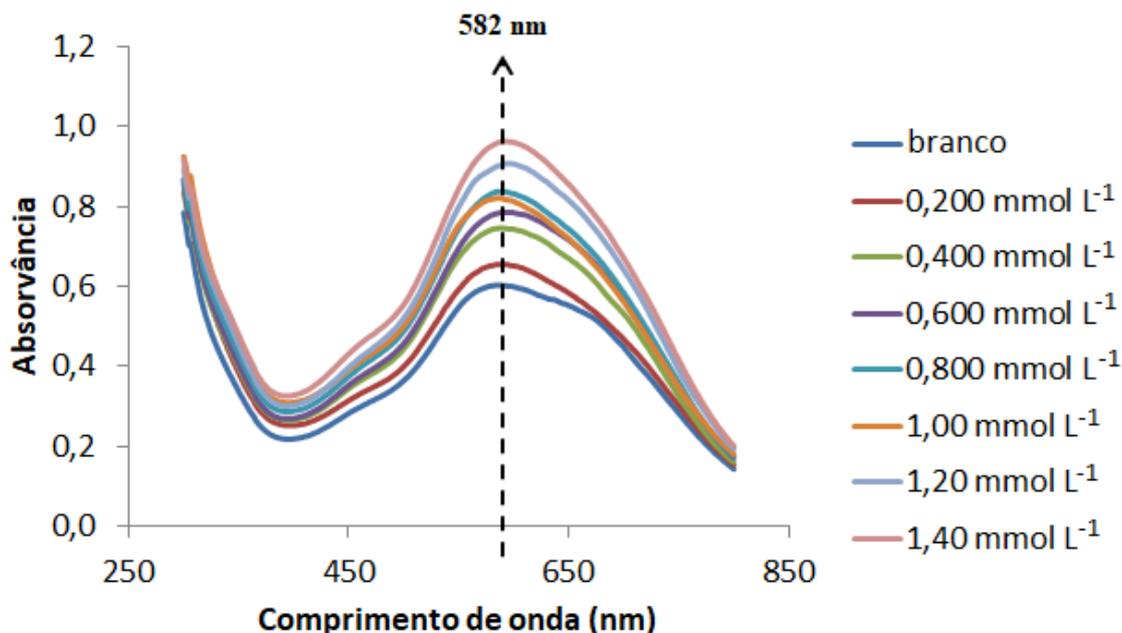


Figura 12. Espectro de absorvância de misturas contendo os padrões de iodato de concentração 0,200 a 1,40 mmol L⁻¹

5.2.2 Construção da curva analítica

A construção da curva analítica foi realizada empregando padrões de glicerol nas concentrações de 10,0 a 70,0 mg L⁻¹ (preparados em triplicata). Estas concentrações reproduzem, teoricamente e com certa aproximação, as concentrações de iodato utilizadas na Figura 12, considerando-se a oxidação completa do glicerol pelo periodato como etapa inicial.

Primeiramente, foi realizada uma otimização do tempo necessário para a oxidação do glicerol com solução de NaIO₄ 5,0 mmol L⁻¹ em tampão 5,5, a partir da verificação da estabilidade dos valores de absorvância dos padrões. Assim, foi esperado que a absorvância atingisse um valor constante ao longo do tempo. Para este fim, foi seguido o procedimento descrito no item 4.5.3, variando-se o tempo de oxidação do glicerol entre 1 e 3 minutos. O tempo mínimo para a estabilização dos valores de absorvância e ausência de variação do sinal foi de 2 minutos, nas condições empregadas.

A curva analítica foi construída de modo que o intervalo linear da curva abrangesse o teor máximo de glicerol permitido pela legislação (0,02% m/m), levando-se em conta a extração do glicerol da amostra de biodiesel a partir da adição dos solventes. Neste caso, 0,02% m/m de glicerol no biodiesel equivale a cerca de 45 mg L⁻¹ de glicerol na solução extratora.

As Figuras 13 e 14 representam as curvas analíticas obtidas a partir de análise de padrões de glicerol no espectrofotômetro de duplo feixe e de feixe único, respectivamente, (conforme item 4.5.3). Os pontos experimentais das curvas analíticas foram plotados a partir da subtração da média da absorvância dos padrões de glicerol ($N = 3$), pela média da absorvância dos brancos ($N = 3$). O ponto da curva correspondente ao padrão de 70,0 mg L⁻¹ de glicerol foi excluído, por comprometer a linearidade das curvas, nestas condições, provavelmente pela proporção dos reagentes empregados na análise.

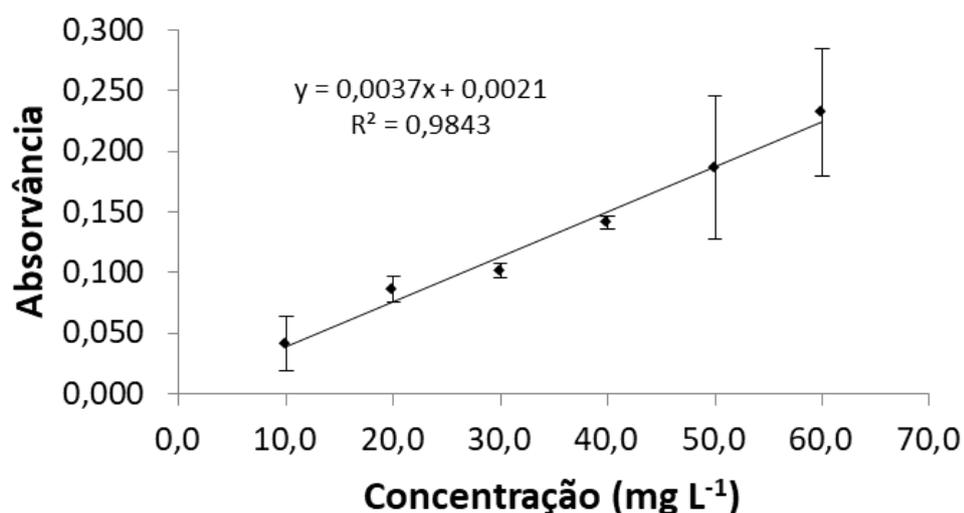


Figura 13. Curva analítica para a determinação do glicerol, obtida no espectrofotômetro de feixe duplo

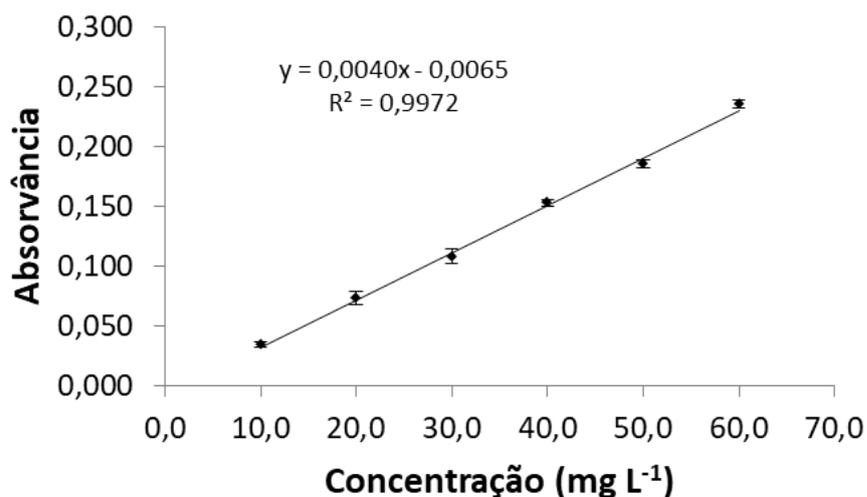


Figura 14. Curva analítica para a determinação do glicerol, obtida no espectrofotômetro de feixe único

É notável a presença de uma boa correlação linear entre as variáveis de cada curva analítica apresentada, o que é um indicativo da aplicabilidade do experimento proposto. A observação das curvas permite atentar que o uso de ambos os equipamentos resultou em sensibilidades equivalentes, evidenciadas pelos coeficientes angulares, a , das curvas analíticas. Contudo, o equipamento de feixe único, de maior simplicidade, apresentou melhor coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9972$), além de apresentar menor desvio padrão nas absorvâncias medidas em cada padrão.

Por esta razão, optou-se por utilizar o equipamento de feixe único para a análise dos biodiesel. Os espectrofotômetros de feixe único, quando comparados aos espectrofotômetros de feixe duplo, apresentam maior razão sinal/ruído. Isto ocorre devido à maior intensidade da radiação incidente sobre a amostra, tendo em vista um menor número de elementos no trajeto

da radiação no espectrofotômetro de feixe único, em comparação ao de feixe duplo, partindo-se de uma mesma fonte (SKOOG et al., 2002). Diante disso, um menor *LD* e *LQ* são encontrados pelo uso do equipamento de feixe único (Equações 2 e 3). Os parâmetros da curva analítica obtida pelo uso de espectrofotômetro de feixe único são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros da curva analítica do método espectrofotométrico em equipamento de feixe único

Sensibilidade (<i>a</i>)	0,0040 ± 0,00010 L mg ⁻¹
Valor-P da inclinação	2,96 × 10 ⁻⁶
Coefficiente linear (<i>b</i>)	-0,0065
Faixa linear de trabalho	0,0-60,0 mg L ⁻¹
<i>s_b</i>	0,002
R²	0,9972
<i>r</i>	0,9986

O LD (1,9 mg L⁻¹) e LQ (5,7 mg L⁻¹) obtidos em solução aquosa equivalem a cerca de 0,0009 %m/m e 0,003 %m/m de glicerol nos biodieseis estudados, respectivamente, considerando as suas diferentes densidades.

A inclinação da curva analítica (*a*) se apresentou significativamente diferente de zero, rejeitando a hipótese nula de que seria igual a zero, por apresentar um *valor-P* < 0,05. Isto indica que mudanças na inclinação desta curva estão associadas às variações nas concentrações, tornando-se expressiva na construção do modelo.

A curva analítica apresentou um bom ajuste linear com coeficiente de correlação (*r*) igual a 0,9986. A linearidade do método analítico foi avaliada frente aos valores dos resíduos da regressão linear (Figura 15). Estes resíduos foram calculados pela diferença do valor previsto pela reta de regressão e os valores obtidos experimentalmente.

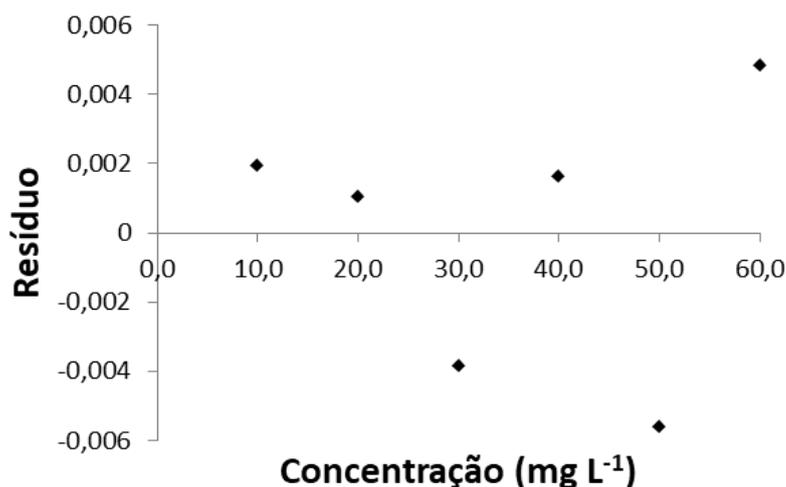


Figura 15. Gráfico de resíduos da regressão linear calculados com os pontos experimentais obtidos pelo método espectrofotométrico

Observa-se que os valores dos resíduos estão distribuídos aleatoriamente, logo o método pode ser considerado como livre de tendências, o que confirma a sua linearidade.

Portanto, a metodologia proposta com determinação espectrofotométrica em equipamento de feixe único apresentou boa linearidade e permitiu a detecção e quantificação de pequenas quantidades de glicerol em matriz aquosa. Diferentemente dos métodos de determinação espectrofotométricos apresentados na literatura, a presente metodologia promoveu a determinação do glicerol a partir do iodato produzido após a oxidação do analito com o periodato, ao invés de explorar a formação do aldeído fórmico, simplificando a análise e evitando o uso de reagentes nocivos e de baixa estabilidade, tal como o reagente acetilacetona (MERCK, 2018; LÔBO et al., 2009).

5.2.3 Determinação do teor de glicerol livre nos biodieseis

As soluções obtidas após a extração do glicerol das amostras de biodiesel foram analisadas empregando a curva analítica obtida com o espectrômetro de feixe único. Os valores de absorvância lidos para as amostras sofreram a subtração da média dos brancos. Para a determinação do teor de glicerol livre nos biodieseis foi empregada a Equação 5.

$$\%m/m = \frac{(A'-b)}{a \times m_{bio}} \times \frac{FD_{bio}}{FD_{pad}} \times V_E \times 10^{-4} \quad (\text{Equação 5})$$

onde:

$\% m/m$ = teor, em g 100 g^{-1} , de glicerol livre;

A' = diferença entre a absorvância da amostra e do branco;

b = coeficiente linear da curva analítica;

a = coeficiente angular da curva analítica, em L mg^{-1} ;

FD_{bio} = fator de diluição na leitura das amostras (20,0);

FD_{pad} = fator de diluição na leitura dos padrões (12,0);

m_{bio} = massa, em gramas, de biodiesel;

V_E = volume, em mL, de fase etanol-água que contém o glicerol (1,60 mL).

O fator de diluição na análise das amostras foi diferente dos padrões para que as absorvâncias das amostras ficassem dentro do intervalo linear da curva analítica. O valor $1,6 \times 10^{-6}$, na Equação 5, representa o volume da fase etanol-água (solução extratora) aliado a um fator de conversão de unidades.

A partir dos teores de glicerol livre ($\% m/m$), obteve-se o teor médio diário ($\overline{\%m/m}$), pela análise de 5 réplicas. Tendo em vista a realização desta determinação em três dias distintos, foi determinada a média aritmética global ($\overline{\%m/m}$). As medidas de dispersão foram calculadas conforme Equações 6, 7, 8 e 9.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (\% m/m - \overline{\%m/m})^2}{N-1}} \quad (\text{Equação 6})$$

$$s_{interm} = \sqrt{\frac{\sum (\overline{\%m/m} - \overline{\overline{\%m/m}})^2}{N-1}} \quad (\text{Equação 7})$$

$$CV = \frac{s}{\overline{\%m/m}} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

$$CV = \frac{s_{interm}}{\overline{\overline{\%m/m}}} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

onde:

$\%m/m$ = teor de glicerol;

$\overline{\%m/m}$ = teor de glicerol médio diário ($N = 5$)

$\overline{\overline{\%m/m}}$ = teor médio global de glicerol, para três dias de análise ($N = 3$).

CV = coeficiente de variação;

s = desvio padrão diário;

s_{interm} = desvio padrão global;

Os valores calculados de teor médio diário e global, assim como seus desvios padrões relacionados à repetibilidade (s) e precisão intermediária (s_{interm}), além dos coeficientes de variação (CV) são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Teor médio diário e global (\pm desvio padrão), em $g\ 100g^{-1}$, de glicerol livre nos biodieseis e coeficiente de variação (CV)

Biodiesel	dia 1		dia 2		dia 3		global	
	$\overline{\%m/m} \pm s$	CV	$\overline{\%m/m} \pm s$	CV	$\overline{\%m/m} \pm s$	CV	$\overline{\overline{\%m/m}} \pm s_{interm}$	CV
Soja	0,029 \pm 0,003	10	0,028 \pm 0,001	4	0,028 \pm 0,003	11	0,028 \pm 0,0004	1,4
Palmiste	0,017 \pm 0,002	12	0,010 \pm 0,001	10	0,0086 \pm 0,0003	3	0,012 \pm 0,005	39
Macaúba	0,044 \pm 0,003	7	0,072 \pm 0,007	10	0,048 \pm 0,002	4	0,046 \pm 0,015	33
Fritura	0,0233 \pm 0,0017	7,3	0,0127 \pm 0,0015	11,8	0,028 \pm 0,002	7	0,021 \pm 0,008	37

O teor médio global de glicerol livre presente no biodiesel de palmiste se apresentou dentro do limite especificado pela ANP (0,02% m/m), enquanto os biodieseis de fritura, soja e macaúba polpa ultrapassaram este limite. Todos os biodieseis avaliados apresentaram valores de precisão aceitáveis em termos de repetibilidade, dentro dos padrões estabelecidos pela ANVISA (2003) que estipula um coeficiente de variação máximo de 15%. Entretanto, em sua nova resolução a ANVISA (2017), assim como o INMETRO (2018) não estabelecem um coeficiente de variação máximo, mas sugerem a avaliação da concentração de trabalho e o objetivo do método para a avaliação da repetibilidade. Assim, tomando como base a baixa concentração de trabalho e o objetivo deste método, as precisões encontradas em termos de repetibilidade foram satisfatórias.

Os teores de glicerol obtidos em cada dia de análise foram comparados pela análise de variância (ANOVA). Na Tabela 7 são apresentados os graus de liberdade (gl), a soma de quadrados (SQ), o quadrado médio (MQ), a estatística F e o *valor-P* da ANOVA. Os graus de liberdade foram calculados com base no número de dias (grupos) e no número total de réplicas. A SQ descreve a variação dos dados entre os dias, dentro dos dias e a soma dessas variações. O MQ representa a razão entre a SQ e gl .

Tabela 7. Tabela ANOVA dos teores de glicerol livre obtidos em três dias de análise, para os diferentes biodieseis

Biodiesel	Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F _{crítico}
Soja	Entre grupos	$1,62 \times 10^{-6}$	2	$8,08 \times 10^{-7}$	0,1257	0,883	3,98
	Dentro dos grupos	$7,07 \times 10^{-5}$	11	$6,43 \times 10^{-6}$			
	Total	$7,23 \times 10^{-5}$	13				
Palmiste	Entre grupos	$1,73 \times 10^{-4}$	2	$8,67 \times 10^{-5}$	39,43	$7,2 \times 10^{-5}$	4,46
	Dentro dos grupos	$1,76 \times 10^{-5}$	8	$2,2 \times 10^{-6}$			
	Total	$1,91 \times 10^{-4}$	10				
Macaúba	Entre grupos	$2,243 \times 10^{-3}$	2	$1,122 \times 10^{-3}$	49,32	$1,6 \times 10^{-6}$	3,89
	Dentro dos grupos	$2,73 \times 10^{-4}$	12	$2,27 \times 10^{-5}$			
	Total	$2,516 \times 10^{-3}$	14				
Fritura	Entre grupos	$6,15 \times 10^{-4}$	2	$3,07 \times 10^{-4}$	102,5	$2,89 \times 10^{-8}$	3,89
	Dentro dos grupos	$3,6 \times 10^{-5}$	12	$3,0 \times 10^{-6}$			
	Total	$6,51 \times 10^{-4}$	14				

Pela tabela 7 pode-se observar que apenas as amostras de biodiesel de soja apresentaram $F < F_{crítico}$, demonstrando que houve diferença entre os teores de glicerol livre obtidos nos três dias de análise. Isto pode ser confirmado pelo *valor-P* obtido (0,883), que indica uma probabilidade de 88,3% de as diferenças observadas na análise do biodiesel de soja não ocorrerem por algum fator inerente ao método. Por outro lado, a partir dos valores de *F* nos biodieseis de palmiste, macaúba e fritura, entende-se que houve variação significativa no teor de glicerol livre obtido em dias diferentes. Apesar disto, a metodologia espectrofotométrica proposta apresentou boa precisão dentro de um mesmo dia, com *CV* inferiores à 12% (Tabela 6).

5.3 Determinação Titrimétrica do Glicerol Livre

Nesta determinação, a princípio, seriam empregadas as mesmas condições reacionais para a oxidação do glicerol realizadas na análise espectrofotométrica. Contudo, na análise de padrões aquosos de glicerol não foi observado boa exatidão, sendo os teores de glicerol bastante inferiores aos dos padrões. Dessa forma, foram realizadas algumas modificações nas proporções dos reagentes e na metodologia empregada (Tabela 8).

Tabela 8. Condições reacionais para a determinação do glicerol por espectrofotometria e titrimetria

Condições reacionais	Espectrofotometria	Titrimetria
Proporção molar glicerol:periodato	1:150 a 1:20	1:50 a 1:10
Proporção molar periodato:molibdato	1:40	1:120
Solvente utilizado no preparo da solução oxidante (NaIO ₄)	tampão acetato de amônio 2,8 mol L ⁻¹	água deionizada
pH da solução oxidante (NaIO ₄)	5,5	6,5
Tempo de oxidação do glicerol (min)	2,0	3,0
Solvente utilizado na extração do glicerol	etanol:água 1:1	água

A solução oxidante (NaIO_4) não foi preparada em meio tamponado como na análise espectrofotométrica, devido aos erros sistemáticos negativos, relativamente altos obtidos na titulação dos padrões de glicerol. Por outro lado, o uso de água deionizada no preparo da solução oxidante gerou erros mais baixos, porém ainda significativos. Por esta razão, a solução oxidante de NaIO_4 passou a ser preparada em água deionizada e partiu-se para a investigação da influência do tempo requerido para a oxidação completa do glicerol pelo periodato.

Hartman (1953) estudou a oxidação do glicerol com o periodato e relatou que o tempo mínimo para a oxidação completa foi de 3 minutos. Segundo os autores, em 2 minutos, apenas 95,5% do glicerol foi oxidado. Assim, foi realizada a análise de padrões de glicerol de 10,0 e 50,0 mg L^{-1} , empregando 3 minutos de oxidação. Nesta condição, foram obtidos erros de apenas 1,0 % e 1,6%, respectivamente.

Isso leva a supor que as condições empregadas no método espectrofotométrico foram inadequadas para a oxidação completa do glicerol pelo periodato, apesar de estas condições terem sido escolhidas empregando informações da literatura. Contudo, como o método espectrofotométrico emprega uma curva analítica, o erro na análise da amostra se reproduz nos padrões analíticos, eliminando o erro. Por outro lado, as condições experimentais requeridas no método titrimétrico devem promover a oxidação completa, por este ser um método absoluto. Pela mesma razão, o método titrimétrico requereu a calibração das vidrarias empregadas para determinar a concentração real (C_{real}) das soluções.

Os solventes utilizados na extração do glicerol da fase do biodiesel foram modificados, em relação ao método espectrofotométrico, a fim de proporcionar uma boa recuperação do glicerol.

5.3.1 Determinação de glicerol livre em padrões aquosos

A metodologia titrimétrica proposta foi testada, inicialmente, em padrões de glicerol de concentrações nominais ($C_{nominal}$) de 10,0 a 50,0 mg L^{-1} , preparados a partir de solução estoque de glicerol de concentração 5.000 mg L^{-1} . Após, foi realizado o preparo e padronização da solução titulante de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,005 mol L^{-1} . O cálculo da concentração molar exata da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,005 mol L^{-1} foi realizado conforme Equação 10.

$$M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = \frac{6 \times (M \times V)_{\text{KIO}_3}}{\bar{V}_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}} \quad (\text{Equação 10})$$

onde:

$M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ = concentração exata, em mol L^{-1} , da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

M_{KIO_3} = concentração exata, em mol L^{-1} , do padrão de KIO_3 ;

$\bar{V}_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ = volume médio, em mL, de titulante $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

V_{KIO_3} = volume, em mL, do padrão KIO_3 .

A concentração (C) dos padrões de glicerol, obtidas pelo método titrimétrico proposto, foi calculada pela Equação 11.

$$C = \frac{M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times (V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} - \bar{V}_B) \times MM_{GL}}{12 \times V_A} \quad (\text{Equação 11})$$

onde:

C = concentração de glicerol, em mg L^{-1} , obtida na titulação;
 $M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ = concentração exata, em mol L^{-1} , da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;
 $V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ = volume, em mL, de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto;
 \bar{V}_B = volume médio, em mL, de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação dos brancos;
 MM_{GL} = massa molar do glicerol ($92090 \text{ mg mol}^{-1}$);
 V_A = volume, em mL, de alíquota da solução extratora titulada.

As concentrações médias de glicerol (\bar{C}) nos padrões foram calculadas a partir da média aritmética das concentrações de glicerol (C) obtidas na titulação dos padrões. As concentrações nominais (C_{nominal}) e reais (C_{real}) obtidas após a calibração das vidrarias, assim como as concentrações médias de glicerol nos padrões, o volume médio de titulante subtraído pelo branco ($V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$) e os respectivos desvios padrão são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Concentração nominal, real e média dos padrões de glicerol (em mg L^{-1}), volume médio de titulante (em mL) e os respectivos desvios padrões

$C_{\text{nominal}} (\text{mg L}^{-1})$	$C_{\text{real}} (\text{mg L}^{-1})$	$\bar{C} \pm s (\text{mg L}^{-1})$	$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \pm s (\text{mL})^a$
10,0	10,2	10,1±0,7	0,263±0,018
20,0	20,4	19,9±0,4	0,518±0,010
30,0	30,7	30,9±2,8	0,81±0,07
40,0	40,9	39,7±1,7	1,02±0,04
50,0	51,1	50,5±1,2	1,30±0,03

^adescontado pelo branco.

A exatidão da análise dos padrões do método titrimétrico foi medida pelo erro relativo percentual das concentrações de glicerol obtidas na titulação em relação às concentrações dos padrões empregados (Equação 12). A avaliação de diferenças significativas entre as concentrações de glicerol foi realizada empregando o teste estatístico t de Student, ao nível de confiança de 95%. O valor de t de Student foi calculado pela Equação 13. A Tabela 10 apresenta o erro relativo entre as concentrações médias de glicerol nos padrões e as concentrações reais, assim como os valores de t de Student calculado e crítico.

$$\% \text{ Erro} = \frac{\bar{C} - C_{\text{real}}}{C_{\text{real}}} \times 100 \quad (\text{Equação 12})$$

$$t = \frac{|\bar{C} - C_{\text{real}}|}{s/\sqrt{N}} \quad (\text{Equação 13})$$

onde:

\bar{C} = concentração média de glicerol nos padrões;

C_{real} = concentração real dos padrões (após calibração das vidrarias);

t = t de Student calculado;

s = desvio padrão das concentrações de glicerol;

N = número de réplicas analisadas.

Tabela 10. Erro relativo percentual e valores de t calculados para a comparação entre as concentrações de glicerol (\bar{C}) obtidas pelo método titrimétrico e os valores dos padrões (C_{real})

$C_{nominal}$ (mg L ⁻¹)	Erro (%)	t	$t_{crítico}$
10,0	-1,6	0,094	2,57 ^a
20,0	-2,7	0,60	2,57 ^a
30,0	0,8	0,033	2,45 ^b
40,0	-3,0	0,27	2,45 ^b
50,0	-1,2	0,22	2,57 ^a

^a $N = 6$; ^b $N = 7$

Os erros relativos obtidos foram inferiores a $\pm 3,0\%$ para todas as concentrações de padrão avaliadas, variando de 0,8% a -3,0%. Os valores de t calculados correspondentes a cada padrão de glicerol foram menores que o valor de $t_{crítico}$, demonstrando a ausência de diferenças significativas entre os teores de glicerol nos padrões e os obtidos na titulação. Isso evidencia boa exatidão do método titrimétrico proposto em soluções aquosas de glicerol.

Para a determinação do LD e do LQ , os volumes médios de titulante e as concentrações dos padrões glicerol (C_{real}) foram utilizados para a construção de uma curva de resposta (Figura 16). O termo “curva de resposta” foi empregado em substituição do termo “curva analítica”, pois o método proposto é absoluto, não requerendo, necessariamente, o uso desta curva para a determinação da concentração de analito na amostra. Os valores dos parâmetros desta curva estão apresentados na Tabela 11.

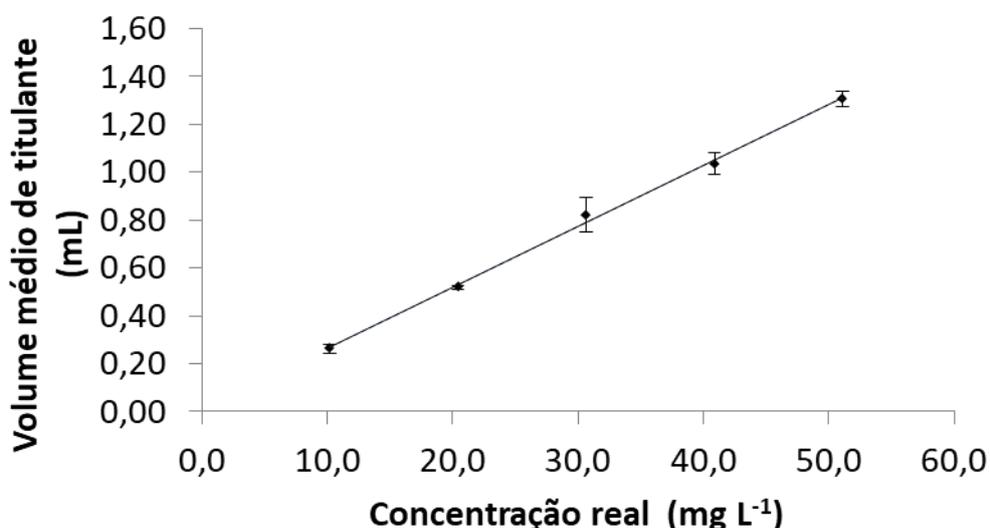


Figura 16. Curva de resposta dos padrões de glicerol obtida por método titrimétrico

Tabela 11. Parâmetros da curva de resposta do método titrimétrico

Coefficiente angular (a)	$0,0254 \pm 0,008 \text{ L}^2 \text{ g}^{-1}$
Valor- P da inclinação	$4,22 \times 10^{-5}$
Coefficiente linear (b)	0,0082 mL
s_b	0,009 mL
R^2	0,9979
r	0,9989

A curva de resposta apresentou boa linearidade, evidenciada pelo valor de r (0,9989) e pelo *valor-P* ($< 0,05$) da inclinação da reta (a). A partir dos parâmetros da curva de resposta (Figura 16 e Tabela 11), foram calculados os valores de LD e o LQ empregando as Equações 2 e 3. Para tal, empregou-se o desvio padrão do volume de titulante gasto na análise de 8 brancos. Os valores obtidos de LD e LQ foram $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ de glicerol em água, que equivalem cerca de $0,0006 \text{ \%m/m}$ e $0,0016 \text{ \%m/m}$ de glicerol em biodiesel, respectivamente, baseando-se nas densidades da matriz.

A partir dos resultados apresentados até o momento, nota-se que método titrimétrico proposto apresenta, em relação aos outros métodos empregados para a determinação de glicerol em matrizes aquosas, excelente exatidão, precisão, LD e LQ , considerando a simplicidade, o baixo custo, a concentração do analito e o tempo requerido para a análise.

Vale ressaltar que o método ASTM 7637, que descreve a determinação do glicerol empregando oxidação com o periodato e titrimetria, só é recomendado para matrizes aquosas com, no mínimo, 75% deste analito, requerendo cerca de 50 minutos para a sua realização. A determinação titrimétrica proposta neste trabalho, por outro lado, requer um pouco mais de 5 minutos. A norma da AOAC 942.22 (1990), que emprega a titulação iodométrica e ácido-base dos produtos da oxidação do glicerol pelo periodato, demanda 1 hora na etapa de oxidação do glicerol com o periodato e utiliza o óxido de arsênio, uma substância de alta toxicidade. Outros métodos alternativos titrimétricos, baseados na titulação do ácido fórmico gerado na oxidação do glicerol, exigem cuidados específicos em razão da interferência do CO_2 , o que aumenta a complexidade e tempo de análise (PISARELLO et al., 2010; AOAC 942.22, 1990).

O tempo de oxidação no método proposto é relativamente baixo (3 minutos) devido ao grande excesso de periodato utilizado, que acelera a reação. Esse excesso não afeta a determinação do iodato em virtude do mascaramento do periodato excedente pelo molibdato. Isto garante uma diferença apropriada entre os volumes de titulante gasto na titulação da amostra e do branco. A importância da titulação do branco se dá devido à contaminação do reagente periodato, por iodato, em razão de sua fotodecomposição (HEAD & STANDING, 1952).

5.3.2 Determinação de glicerol livre nos biodieseis

Uma vez verificado o êxito do método titrimétrico na determinação de glicerol em matriz aquosa, o procedimento foi aplicado aos biodieseis sintetizados. As análises foram realizadas em cinco réplicas, em três dias distintos. O método de extração líquido-líquido utilizado envolveu o uso de água deionizada e n-heptano, para a separação do glicerol em uma massa referente a $400 \mu\text{L}$ de biodiesel. O cálculo do teor de glicerol em biodiesel foi realizado conforme a Equação 14.

$$\%m/m = \frac{(V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} - \bar{V}_B) \times V_E \times MM_{GL} \times M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}}{12 \times 10^3 \times V_A \times m_{bio}} \times 100 \quad (\text{Equação 14})$$

onde:

$\%m/m$ = teor de glicerol, em $\text{g } 100\text{g}^{-1}$;

$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ = volume, em mL, de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação da solução extratora;

\bar{V}_B = volume médio, em mL, de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação dos brancos;

V_E = volume, em mL, de fase aquosa que contém o glicerol (1,60 mL);

MM_{GL} = massa molar do glicerol ($92,09 \text{ g mol}^{-1}$);

$M_{Na_2S_2O_3}$ = concentração exata, em mol L⁻¹, da solução de Na₂S₂O₃;
 V_A = volume, em mL, de alíquota da solução extratora titulada;
 m_{bio} = massa de biodiesel, em gramas.

O teor médio de glicerol ($\overline{\%m/m}$) foi calculado a partir dos teores de glicerol ($\%m/m$) (Equação 14) obtidos pela análise das réplicas ($N=5$) de amostra de biodiesel. O teor médio global de glicerol ($\overline{\%m/m}$) nos biodieseis foi calculado a partir da média aritmética ($N=3$) dos teores médios de glicerol obtidos em três dias (Tabela 12).

Tabela 12. Teores médios diário e global (\pm desvio padrão), em g 100g⁻¹, de glicerol livre nos biodieseis e seus respectivos coeficientes de variação (CV)

Biodiesel	dia 1		dia 2		dia 3		global	
	$\overline{\%m/m} \pm s$	CV	$\overline{\%m/m} \pm s$	CV	$\overline{\%m/m} \pm s$	CV	$\overline{\%m/m} \pm s_{interm}$	CV
Soja	0,031 \pm 0,004	14	0,0268 \pm 0,0017	7	0,0310 \pm 0,0004	1,4	0,030 \pm 0,002	8
Palmiste	0,0112 \pm 0,0005	4	0,0114 \pm 0,0003	3	0,0114 \pm 0,0011	10	0,01132 \pm 0,00013	1,1
Macaúba	0,0552 \pm 0,0016	3	0,052 \pm 0,006	11	0,053 \pm 0,005	9	0,0532 \pm 0,0018	3
Fritura	0,017 \pm 0,002	14	0,018 \pm 0,003	14	0,0179 \pm 0,0007	4	0,0178 \pm 0,0004	2

A precisão em termos de repetibilidade foi boa em todos os biodieseis analisados nos três dias, pois seus CV foram menores que 15%. A precisão intermediária apresentou valores de coeficiente de variação substancialmente menores que os apresentados pelo método espectrofotométrico, com exceção para o biodiesel de soja, que foi maior. Para avaliar estatisticamente, a precisão intermediária através da comparação entre os teores de glicerol obtidos em cada dia, foi utilizado o teste ANOVA (Tabela 13).

Tabela 13. Tabela ANOVA dos teores de glicerol livre obtidos em três dias de análise, para os diferentes biodieseis

Biodiesel	Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F _{crítico}
Soja	Entre grupos	$4,79 \times 10^{-5}$	2	$2,39 \times 10^{-5}$	4,46	0,0451	4,26
	Dentro dos grupos	$4,83 \times 10^{-5}$	9	$5,36 \times 10^{-6}$			
	Total	$9,61 \times 10^{-5}$	11				
Palmiste	Entre grupos	$1,69 \times 10^{-7}$	2	$8,45 \times 10^{-8}$	0,163	0,851	3,89
	Dentro dos grupos	$6,21 \times 10^{-6}$	12	$5,17 \times 10^{-7}$			
	Total	$6,37 \times 10^{-6}$	14				
Macaúba	Entre grupos	$1,17 \times 10^{-5}$	2	$5,83 \times 10^{-6}$	0,496	0,622	3,98
	Dentro dos grupos	$1,29 \times 10^{-4}$	11	$1,17 \times 10^{-5}$			
	Total	$1,41 \times 10^{-4}$	13				
Fritura	Entre grupos	$2,64 \times 10^{-6}$	2	$1,32 \times 10^{-6}$	0,273	0,764	3,59
	Dentro dos grupos	$8,22 \times 10^{-5}$	17	$4,84 \times 10^{-6}$			
	Total	$8,48 \times 10^{-5}$	19				

A partir dos resultados da ANOVA foi possível constatar que nos biodieseis de palmiste, macaúba (polpa) e fritura, os teores de glicerol livre obtidos entre três dias de

análise foram semelhantes ($F < F_{critico}$) entre si. Esta evidência foi confirmada pelo *valor-P* do teste estatístico. Os biodieseis de palmiste, macaúba e fritura apresentaram um *valor-P* $> 0,05$, com probabilidades de 85,1%, 62,2% e 76,4%, respectivamente, de as variações na análise ocorrerem pelo acaso.

O biodiesel de soja apresentou *CV* relativamente alto (8%) em termos de precisão intermediária, e segundo o valor de *F* (4,46) e o *valor-P* (0,0451) encontrados na ANOVA, os teores de glicerol livre obtidos em três dias da análise deste biodiesel foram estatisticamente diferentes.

A exatidão do método titrimétrico foi avaliada através de ensaio de recuperação a partir da fortificação de 100 µL de amostra de biodiesel com 100 µL de padrões de glicerol preparados em 3 níveis de concentração (250, 500 e 1000 mg L⁻¹). Desta maneira, o acréscimo de glicerol livre equivale a fortificação de 0,03, 0,06 e 0,13 % m/m.

A porcentagem de recuperação (*%Rec*) de cada réplica foi calculada conforme Equação 15. A recuperação média foi calculada com base em cinco réplicas utilizadas na análise, para cada nível de adição de glicerol. Os resultados do ensaio de recuperação para a determinação do teor de glicerol livre utilizado como medida de exatidão são apresentados na Tabela 14.

$$\% Rec = \frac{\%m/m_{fort} - \%m/m_{bio}}{\%m/m_{adi}} \times 100 \quad (\text{Equação 15})$$

onde:

$\%m/m_{fort}$ = teor de glicerol, em g 100g⁻¹, na amostra fortificada;

$\%m/m_{bio}$ = teor de glicerol, em g 100g⁻¹, no biodiesel;

$\%m/m_{adi}$ = teor de glicerol, em g 100g⁻¹, adicionado.

Tabela 14. Porcentagem de recuperação \pm desvio padrão ($\% \overline{Rec} \pm s$) do glicerol adicionado ao biodiesel

Biodiesel	Fortificação (mg L ⁻¹)	$\% \overline{Rec} \pm s$
Soja	250	91 \pm 6
	500	91 \pm 6
	1000	91 \pm 5
Palmiste	250	95 \pm 5
	500	96 \pm 4
	1000	93,0 \pm 0,4
Macaúba	250	105 \pm 3
	500	99 \pm 3
	1000	101 \pm 4
Fritura	250	103 \pm 6
	500	98 \pm 4
	1000	98 \pm 8

De acordo com a Tabela 14, os valores de exatidão do método, medidos em termos de porcentagem de recuperação, ficaram entre 91 e 105%. Os valores de recuperação foram bons e dentro dos padrões recomendados pela AOAC (2012), de 90 a 107% para analito na faixa de concentração de trabalho.

Desta forma, pode-se constatar que o método titrimétrico estudado quantificou os conteúdos de glicerol presente em todas as matrizes analisadas com relativa exatidão. Pode-se

concluir que a extração do analito realizada neste método foi apropriada para a sua determinação. Assim, é possível reconhecer a confiabilidade da metodologia proposta, visto que se mostrou, além de tudo, seletiva, possibilitando a quantificação do glicerol, mesmo na presença do periodato interferente. Além de seletividade, a metodologia apresentou boa repetibilidade na análise de todos os biodieseis estudados, e boa precisão intermediária na análise dos biodieseis em diferentes dias.

Os métodos titrimétricos baseados na quantificação do iodato formado na oxidação do glicerol pelo periodato (citados na literatura) requerem longo tempo de análise e empregam grande quantidade de biodiesel para garantir os níveis de analito acima dos limites de quantificação, devido aos baixos teores do analito nestas matrizes. Testes titrimétricos preliminares devem ser empregados em padrões/amostras e branco, de modo a obter uma diferença de volume de titulante aceitável para a quantificação (AOCS Ca 14-56, 2017; ABNT NBR 15771, 2009). Em contrapartida, o método proposto possibilitou o uso de baixa quantidade de biodiesel, garantindo facilidade no procedimento de extração do glicerol, em escala semi-micro, o que diminuiu o tempo de análise. Apesar de os resultados serem satisfatórios, a extração poderia ser realizada em escala macro para o alcance de resultados mais exatos e precisos, porém isto aumentaria o tempo de análise.

A metodologia desenvolvida propiciou ainda o uso de uma técnica de medição simples e acessível, quando comparada às técnicas usualmente empregadas, como as cromatográficas, eletroanalíticas, enzimáticas e espectrofotométricas, de relativa rapidez e vantagens equivalentes a superiores aos outros métodos aqui mencionados (RIBEIRO et al., 2013; VALDEZ et al., 2012; LOURENÇO & STRADIOTTO, 2009; HAJÉK et al., 2006; MITTELBAACH et al., 1996).

5.4 Comparação dos Métodos Espectrofotométrico e Titrimétrico

Os teores médios de glicerol livre nos biodieseis obtidos pelos métodos espectrofotométrico e titrimétrico foram comparados para avaliar se houve diferença significativa entre os resultados, utilizando o teste *t* de Student para a comparação de duas médias experimentais. Anteriormente à aplicação deste teste estatístico, foi avaliada a ausência ou presença de diferenças significativas entre as variâncias dos dois métodos a um *NC* de 95 %, empregando o teste *F* (Equação 16).

$$F = \frac{s_{interm1}^2}{s_{interm2}^2} \quad (\text{Equação 16})$$

onde:

F = parâmetro estatístico do teste *F*;

$s_{interm1}^2$ = variância intermediária do método de menor precisão;

$s_{interm2}^2$ = variância intermediária do método de maior precisão.

O teste *F* constatou a presença de diferenças significativas entre as variâncias de ambos os métodos estudados a um *NC* de 95% ($F_{crit} = 19,00$; *gl* = 2 no numerador e denominador). Desta maneira, o cálculo realizado para a realização do teste estatístico *t* de Student foi realizado empregando a Equação 17.

$$t = \frac{|\% \overline{m/m}_e - \% \overline{m/m}_t|}{\frac{s_{interm1}^2}{N_1} + \frac{s_{interm2}^2}{N_2}} \quad (\text{Equação 17})$$

onde:

$t = t$ de Student calculado;

$\% \overline{m/m}_e$ = teor médio global de glicerol, em g 100 g⁻¹, obtido pelo método espectrofotométrico;

$\% \overline{m/m}_t$ = teor médio global de glicerol, em g 100 g⁻¹, obtido pelo método titrimétrico;

$s_{interm1}^2$ = variância intermediária do método de menor precisão;

$s_{interm2}^2$ = variância intermediária do método de maior precisão;

N_1 e N_2 = número de dias de ensaio de cada método (3).

O número de graus de liberdade (gl) utilizados para o $t_{crítico}$ foi calculado conforme a Equação 18. Os valores encontrados no teste estatístico F e t de Student, correspondentes aos teores médios finais de glicerol obtidos nos dois métodos propostos são apresentados na Tabela 15.

$$gl = \left[\frac{\left(\frac{s_{interm1}^2}{N_1} + \frac{s_{interm2}^2}{N_2} \right)^2}{\left(\frac{s_{interm1}^2}{N_1+1} \right)^2 + \left(\frac{s_{interm2}^2}{N_2+1} \right)^2} \right] - 2 \quad (\text{Equação 18})$$

onde:

gl = grau de liberdade;

$s_{interm1}^2$ = variância intermediária do método de menor precisão;

$s_{interm2}^2$ = variância intermediária do método de maior precisão;

N_1 e N_2 = número de dias de ensaio de cada método (3).

Tabela 15. Teor médio global (\pm desvio padrão), em g 100g⁻¹, de glicerol livre nos biodieseis e parâmetros estatísticos para comparação entre os métodos estudados

Biodiesel	Método espectrofotométrico	Método titrimétrico	Parâmetros estatísticos	
	$\% \overline{m/m} \pm s_{interm}$	$\% \overline{m/m} \pm s_{interm}$	F	t
Soja	0,0281 \pm 0,0004	0,030 \pm 0,002	33,4	1,01
Palmiste	0,012 \pm 0,005	0,0113 \pm 0,00013	1308,6	0,29
Macaúba	0,046 \pm 0,015	0,0532 \pm 0,0018	67,6	0,84
Fritura	0,021 \pm 0,008	0,0178 \pm 0,0004	345,4	0,77

$F_{crítico} = 19,00$; $gl = 2$; $t_{crítico} = 4,30$

Observa-se que todos os valores de t calculados foram menores que o valor de t crítico, considerando um NC igual 95%. Isso demonstra que os teores de glicerol médio obtidos pelos métodos propostos foram estatisticamente semelhantes, apesar das diferenças relacionadas ao método de extração, pH e tempo de oxidação do glicerol e técnica de determinação utilizada.

Ainda que não tenha sido avaliada a exatidão do método espectrofotométrico, os resultados obtidos no ensaio de recuperação do método titrimétrico, permitem certificar boa

exatidão do método espectrofotométrico, visto que os teores médios finais de glicerol livre determinados por ambos os métodos foram equivalentes.

O método espectrofotométrico apresentou variações bastante significativas entre os dias de análise, provavelmente pelo uso do amido que apresenta instabilidade. Durante as análises, foi notada a presença de sólidos em suspensão nas misturas realizadas nos tubos de ensaio, o que poderia ter provocado oscilações nas leituras. O amido é formado por duas frações de polissacarídeos, a amilose e amilopectina. A amilose apresenta uma estrutura linear, podendo formar ligações de hidrogênio e levando à formação de cristais, dependendo de condições tais como pH, concentração de sólidos, conservação e temperatura (SILVA, 2008; PARKER, 2001). Contudo, os teores globais de glicerol livre em biodiesel obtido por ambos os métodos apresentaram semelhança comprovada por tratamento estatístico.

Os limites de detecção ($1,2 \text{ mg L}^{-1}$ ou $0,0006 \text{ \%m/m}$) e quantificação ($3,5 \text{ mg L}^{-1}$ ou $0,0016 \text{ \%m/m}$) obtidos por titrimetria apresentaram valores levemente mais baixos quando comparados ao método espectrofotométrico ($1,9 \text{ mg L}^{-1}$ ou $0,0009 \text{ \%m/m}$; e $5,7 \text{ mg L}^{-1}$ ou $0,003 \text{ \%m/m}$). Considerando a diferença entre as densidades da água e do biodiesel, o *LD* e *LQ* dos dois métodos estudados são menores que o limite fixado de glicerol livre em biodiesel ($0,02\% \text{ m/m}$) pela ANP (2014).

O método titrimétrico ($CV < 14\%$), apresentou variações aleatórias em termos de repetibilidade, assim como o método espectrofotométrico ($CV < 12\%$), na análise dos diferentes biodieseis. O método titrimétrico não permite a medição de pequenas variações de volume com grande precisão, pois além da precisão associada ao instrumento de medição, há a influência da medição pelo analista. Entretanto, além desses fatores, os diferentes métodos de extração podem ter influenciado a dispersão das medidas. Poucas variações foram obtidas na análise dos padrões aquosos de glicerol ($CV < 9,1\%$) por titrimetria. Diante disso, ambos os métodos apresentaram repetibilidades compatíveis e satisfatórias.

Perante o exposto, o método titrimétrico apresentou certas vantagens em comparação ao espectrofotométrico. O método com detecção titrimétrica foi mais acessível, em termos econômicos e práticos, além de reproduzir teores de glicerol semelhantes ao longo dos dias de análise, uma vez que no método espectrofotométrico houve variações bastante significativas. Assim, o uso do amido na titulação não gerou um impacto significativo na medição dos volumes entre os dias, visto que foi apenas utilizado como solução indicadora. Além disto, não há a necessidade do uso de curva analítica e de padrões aquosos na análise do biodiesel por titrimetria. O método titrimétrico permitiu realizar a quantificação de glicerol em baixas concentrações empregando pequena quantidade de amostra, em níveis normalmente não alcançados por outros métodos baseados na titulação.

Conjuntamente, os métodos apresentaram robustez frente às diferentes composições químicas dos biodieseis estudados, ou seja, os métodos não sofreram interferência da matriz, opostamente às metodologias descritas pelas normas usualmente utilizadas que apresentam aplicação restrita para determinados biodieseis.

CONCLUSÃO

A estratégia proposta de mascaramento do periodato excedente com molibdato se mostrou vantajosa na determinação de glicerol livre em biodiesel, em comparação aos métodos de determinação de glicerol livre citados na literatura. A complexação do periodato remanescente permitiu o uso de um excesso de periodato na oxidação do glicerol e consequente diminuição do tempo requerido na análise.

A determinação do glicerol livre nos biodieseis por espectrofotometria demonstrou menores flutuações de sinal em instrumento de feixe simples, em comparação ao de feixe duplo. O método apresentou boa repetibilidade, entretanto, exibiu variações consideráveis entre os dias de análise, segundo o teste estatístico ANOVA. Esta variação, possivelmente poderia ser diminuída pelo uso de solução de amido em mistura glicerol:água.

A determinação titrimétrica do glicerol livre demonstrou excelente exatidão na análise de padrões aquosos de glicerol, o que foi evidenciado pelos baixos erros obtidos (inferiores a 3,0%) e pela avaliação da semelhança dos teores de glicerol nos padrões pelo teste estatístico *t* de Student.

A análise das amostras de biodiesel por titrimetria apresentou exatidão aceitável demonstrada por ensaios de recuperação, o que apontou uma boa seletividade do método. As medidas de repetibilidade foram satisfatórias para todos os biodieseis estudados, entretanto, os parâmetros *F* e *valor-P* da ANOVA indicaram uma diferença estatística entre os teores de glicerol livre no biodiesel de soja obtidos entre os dias. Entretanto, a grande dispersão intermediária obtida se deu porque os teores encontrados no primeiro e terceiro dias foram bastante próximos (0,310 e 0,31% m/m, Tabela 12). Assim, o teor de glicerol livre obtido no segundo dia (0,0268 % m/m) poderia ser eliminado pelo teste de Grubbs, diminuindo a dispersão, o que resultaria em uma semelhança estatística dos teores de glicerol encontrados no biodiesel de soja. Este dado não foi eliminado a fim de manter os mesmos graus de liberdade na comparação estatística dos métodos estudados. De maneira geral, apesar disto, as medidas de precisão intermediária no método titrimétrico, foram predominantemente melhores que no método espectrofotométrico, ao se fazer a comparação dos teores de glicerol livre obtidos entre os dias de análise pela ANOVA.

Os dois métodos desenvolvidos apresentaram resultados semelhantes estatisticamente, quanto ao teor de glicerol livre nas diferentes matrizes estudadas, com base no teste *t* de Student. Entretanto, o método titrimétrico exibiu certas vantagens em relação ao espectrofotométrico, como baixo custo e praticidade na execução dos ensaios. A utilização de bureta volumétrica, um instrumento de medida de precisão, embora simples e acessível, tornou possível o desenvolvimento de uma metodologia rápida e de baixa complexidade. Além disso, o método titrimétrico permitiu quantificar o glicerol em baixa quantidade de amostra, em níveis de concentração normalmente não alcançados por outros métodos titrimétricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT, 2009. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15771**. Biodiesel — Determinação de glicerina livre — Método volumétrico. BRASIL, 2009.

ABNT, 2015. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15908**. Biodiesel — Determinação do glicerol livre, mono-, di-, triacilgliceróis e glicerol total por cromatografia gasosa. BRASIL, 2015.

ANP, 2019. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Informações de Mercado**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>. Atualizado em: 21/06/2019. Acesso em: 09/07/2019.

ANP, 2014. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **RESOLUÇÃO ANP Nº 45**, de 25 de agosto de 2014, publicada no DOU de 26 de agosto de 2014, *que dispõe sobre a especificação do biodiesel contida no Regulamento Técnico ANP nº 3 de 2014 e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional*. 2014.

ANP, 2012. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **RESOLUÇÃO ANP Nº 14**, de 11 de maio de 2014, publicada no DOU de 18 de maio de 2012, *que define o biodiesel como um combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil*, 2012.

AFKHAMI, A.; ZAREI, A.R. Spectrophotometric determination of periodate and iodate by a differential kinetic method. **Talanta**, v. 53, n. 4, p. 815-821, 2001.

AMARAL, F.P.; BROETTO, F; BATISTELLA, C.B.; JORGE, S.M.A. Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex Mart] coletada na região de Botucatu - SP. **Energia na Agricultura**, v. 26, n. 1, p. 12-20, 2011.

ANVISA, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – **RE Nº 899**, 29/05/2003. Guia para validação de métodos analíticos – maio de 2003.

ANVISA, 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166**, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017.

AOAC, 1990. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC 942.22**: Cosmetics – Vanishing cream – Glycerol, EUA, 1990.

AOCS, 2017. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **AOCS CA 14-56**: Total free and combined glycerol – iodimetric – periodic acid method, EUA, 2017.

APOLINÁRIO, F.D.B.; PEREIRA, G.F.; FERREIRA, J.P. Biodiesel e Alternativas para utilização da glicerina resultante. **Revista de Divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v. 2, n. 1, p.141- 146. 2012.

ARRUDA, P.V. de; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n. 26, p. 56-62, 2006.

ASTM, 2007. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D 6751**: Test Method for determination of free and total glycerine in B-100 biodiesel methyl esters by Gas Chromatography, EUA, 2007.

ASTM, 2015. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM 7637**: Standard test method for determination of glycerin assay by titration (Sodium Metaperiodate), EUA, 2015.

ASTM, 2017. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D6584**: Standard test method for determination of total monoglycerides, total diglycerides, total triglycerides, and free and total glycerin in B-100 biodiesel methyl esters by Gas Chromatography, EUA, 2017.

BALAT, M.; BALAT, H.A. A critical review of biodiesel as a vehicular fuel. **Energy Conversion and Management**, v. 49, n. 10, p. 2727-2741, 2008.

BARBOSA, T. **Determinação eletroquímica de glicerol em biodiesel por amperometria de múltiplos pulsos com eletrodo de ouro**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y.J.K; LIMA, D.P. **Glicerol**: um breve histórico e aplicação em sínteses estéreo-seletivas. 2011.

BELCHER, R.; TOWNSHEND, A. The consecutive titration of iodate and periodate. **Analytica Chimica Acta**, v. 41, p. 395-397, 1968.

BIODIESELBR. Vantagens do Biodiesel. **Revista BiodieselBR**. 2011. Disponível em: <https://www.biodieselbr.com/biodiesel/vantagens/vantagens-biodiesel>. Acesso em: 8 de julho de 2019.

BONDIOLI, P.; BELLA, L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 3, p. 153-157, 2005.

BURGOT, J. **Ionic Equilibria in Analytical Chemistry**. 1st ed. New York: Springer. 2012.

CALVALCANTE, P.P.M; SILVA, R.L.; FREITAS, J.J.R.; FREITAS, J.C.R.; FILHO, J.R.F. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación química**, v. 26, n. 4, p. 319-329, 2015.

CEN, 2011. EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **EN-14106**. Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of free glycerol contents. Belgic, 2003.

CEN, 2011. EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, **EN-14105**. Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents. Belgic, 2011.

CHEN, W.C.; LI P.Y.; CHOU, C.H.; CHANG, J.L.; ZEN, J.M. A nonenzymatic approach for selective and sensitive determination of glycerol in biodiesel based on a PtRu-modified screen-printed edge band ultramicroelectrode. **Electrochimica Acta**, v. 153, p. 295-299, 2015.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.

CNPE, 2018. CONSELHO NACIONAL DE POLÍTICA ENERGÉTICA – **CNPE RESOLUÇÃO Nº 16**, de 29 de outubro de 2018, que dispõe sobre a evolução da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional.

CORAL, N.; RODRIGUES E.; RUMJANEK, V., ZAMIAN, J.R.; FILHO, G.N.R.; COSTA, C.E.F. Soybean biodiesel methyl esters, free glycerin and acid number quantification by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 69 - 71, 2013.

CREMONEZ, P.A.; FEROLDI, M.; NADALETI, W.C.; DE ROSSI, E.; FEIDEN, A.; DE CAMARGO, P.M.; CREMONEZ, F.E.; KLAJN, F.F. Biodiesel production in Brazil: current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 415 - 428, 2015.

CRIEGEE, R., KRAFT, L.; RANK B. Glycol splitting, its mechanism and its use in chemical problems, **Annalen**, v. 507, p. 159 – 197, 1933.

DUSHMAN, S. The rate of the reaction between iodic and hidriodic acids. **Journal Physical Chemistry**, v. 8, n. 7, p 453 – 482, 1904.

ENSAFI, A.A.; CHAMJANGALI, A.M. Sequential flow injection determination of iodate and periodate with spectrophotometric detection. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, n. 12, p. 2897 - 2903, 2003.

ENSAFI, A.A.; DEHAGHI, B.G. Flow-injection simultaneous determination of iodate and periodate by spectrophotometric and spectrofluorometric detection. **Analytical Sciences**, v. 16, n. 1, p. 61 - 64, 2000.

FLEURY, P.; LANGE, J. Sur l'oxydation des acides alcools et des sucres par l'acid periodique. **Comptes Rendus Academic Sciences**, v. 195, p. 1395-1397, Paris, 1932.

FREITAS G.R.S de.; JUNIOR, H.S. PEREIRA, F.R.S; FARIAS, R.F; PEREIRA, F.C. Iodate analysis in table salt. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 93 - 109, 2011.

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

HÁJEK, M.; SKOPAL, F.; MACHEK, J. Determination of free glycerol in biodiesel, **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 8, p. 666 - 669, 2006.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**, 6ª Edição, LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro - RJ, 2005.

HARTMAN, L. Rapid determination of glycerol by the potassium periodate method. **Journal of Applied Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 308 - 311, 1953.

HEAD, F.S.H.; STANDING, H.A. Reactions in aqueous solutions of sodium metaperiodate exposed to artificial light. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 1457-1460, 1952.

INMETRO, 2018. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientações Sobre Validação de Métodos Analíticos**. Revisão 07 - Jul/2018.

LIDE, D.R. **Handbook of Chemistry and Physics**, 87th ed., Taylor and Francis Group: Boca Raton, 2006.

LIMA, M.B.; INSAUSTI M.; DOMINI, C.E.; PISTONESI M.F.; ARAÚJO, M.C.U.; BAND, B.S.F. Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction. **Talanta**, v. 89, p. 21 - 26, 2012.

LÔBO, I.P.; FERREIRA, S.L.C.; CRUZ, R.S. Biodiesel: quality parameters and analytical methods. **Química nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

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

LOZANO, P.; CHIRAT, N.; GRAILLE, J.; PIOCH, D. Measurement of Free Glycerol in Biofuels, **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 354, p. 319 - 322, 1996.

LUETKMEYER, T.; SANTOS, R.M; SILVA, A.B.; AMADO, R.S.; VIEIRA, E.C. Analysis of free and total glycerol in biodiesel using an electrochemical assay Based on a two-enzyme oxygen-electrode System. **Electroanalysis**, v. 22, n. 9, p. 995 - 999, 2010.

MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1 - 15, 1999.

MALAPRADE, L. Oxidation of some polyalcohols by periodic acid—applications. **Comptes Rendus, Académie Sciences** v. 186, p. 382-384, 1928.

MARQUES, E.P; SILVA, V.D., ALMEIDA, J.M.S; COSTA, H.D., CAVALCANTE, G.H.R., MARQUES, A.L.B. Metodologia analítica para glicerol em biodiesel: cenário atual. **Cadernos de Pesquisa**, 2012.

MELLO, M.R.P.A; BARBOSA, J. Confiabilidade dos resultados analíticos no monitoramento do teor de iodo em sal para o consumo humano - Validação da metodologia e incerteza de medição. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 65 - 74, 2015.

MENEGHETTI, S.P.; MENEGHETTI, M.R.; BRITO, Y.C. A reação de transesterificação, algumas aplicações e obtenção de biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 63-73, 2013.

MERCK. **Ficha de Dados de Segurança**. Regulamento (CE) no. 1907/2006. Revisão 22/07/2018.

MITTELBACH, M.; ROTH, G.; BERGMANN, A. Simultaneous gas chromatographic determination of methanol and free glycerol in biodiesel. **Chromatographia**, v. 42, n. 7 - 8, p. 431 - 434, 1996.

MOTA, C.J.A.; PESTANA, C.F.M. Co-produtos da Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 416 - 425, 2011.

NAKASHIMA, Y., SHEN, H., KUSYAMA, K., Simultaneous determination of periodate and iodate by capillary electrophoresis, **Analytical Science**, v. 15, p. 725 – 728, 1999.

NEHER, A.; HAAS, T.; ARNTZ, D.; KLENK, H.; GIRKE, W. Process for the production of acrolein. **USPTO Patent Full**. Patent nº 5, v. 387, p. 720, 1995.

NOGUEIRA, Thiago. **Eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato aplicada à avaliação da qualidade de biocombustíveis (biodiesel e etanol) e ao estudo sobre os processos de oxidação do biodiesel**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PARKER, R.; RING, S.G. Aspects of the physical chemistry of starch. **Journal of Cereal Science**, v. 34, n. 1, p. 1 - 17, 2001.

PEREIRA, A.V.; PENCKOWSKI, L.; VOSGERAU, M.; SASSÁ, M.F. Determinação espectrofotométrica de dipirona em produtos farmacêuticos por injeção em fluxo pela geração de íons tri-iodeto. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 553 - 557, 2002.

PERLIN, A.S. Glycol-cleavage oxidation. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 60, p. 183 - 250, 2006.

PICCIN, J.S.; MAGRO, F.G.; BRIÃO, V.B.; COLLA, M.L. Purificação de biodiesel por adsorventes: uma revisão. **VETOR - Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 25, n. 2, p. 68 - 75, 2015.

PINZI, S.; CAPOTE, F.P.; JIMÉNEZ, R.J.; DORADO, M.P.; CASTRO, M.D.L. Flow injection analysis-based methodology for automatic on-line monitoring and quality control for biodiesel production. **Bioresource Technology**. V. 100, p. 421 - 427, 2009.

PISARELLO, M.L.; COSTA, B.O.D.; VEIZAGA, N.S.; QUERINI, C.A. Volumetric method for free and total glycerin determination in biodiesel. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 19, p. 8935 - 8941, 2010.

PROKOPOWICZ, A.; ZACIERA, M.; SOBCZAK, A.; BIELACZYK, P.; WOODBURN, J. The effects of neat biodiesel and biodiesel and HVO blends in diesel fuel on exhaust

emissions from a light duty vehicle with a diesel engine. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 12, p. 7473 - 7482, 2015.

QUADROS, D.P.C; CHAVES, E.S; SILVA, J.S.A., TEIXEIRA, L.S.G; CURTIUS, A.J., PEREIRA, P.A.P. Contaminantes em biodiesel e controle de qualidade. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 376-384, 2011.

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

ROCHA Jr., J.G; SANTOS, M.D.R; MADEIRA, F.B.; ROCHA, S.F.L.S.; BAUERFELDT, G.F.; SILVA, W.L.G.; SALOMÃO, A.A.; TUBINO, M. Influence of fatty acid methyl ester composition, acid value, and water content on metallic copper corrosion caused by biodiesel. **Journal Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1751 - 1761, 2019.

RUSCHEL, C.F.P; FERRÃO, M.F.; SANTOS, F.P.; SAMIOS, D. Otimização do processo de transesterificação em duas etapas para produção de biodiesel através do planejamento experimental Doehlert. **Química nova**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 267 - 272, 2016.

SILVA, R.B; FERREIRA, G.F.; AYUMI, M.; HAAS, A.; SCHERER, L.M; LANDI, C.M.; DEMIATE, I.M. Características físico-químicas de amidos modificados com permanganato de potássio/ácido láctico e hipoclorito de sódio/ácido láctico. **Ciência de Tecnologia em Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p.66-77, jan./mar. 2008.

SILVA, S.G.; RUBIO, A.M.; de LA GUARDIA, M.; ROCHA, F.R.P. Sequential spectrofluorimetric determination of free and total glycerol in biodiesel in a multicommuted flow system, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 1, p. 365 - 371, 2011.

SILVA, T.A.R.; NETO, W.B. Estudo da redução da acidez do óleo residual para a produção de biodiesel utilizando planejamento fatorial fracionado. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 5, p. 828 - 839, 2013.

SILVA, W.L.G; SALOMÃO, A.A.; SOUZA, P.T.; ANSOLIN, M.; TUBINO, M. Misturas Binárias de Biodiesel a partir de Óleo de Macaúba (*Acromia aculeata*) com outros biodieseis. **Revista da Sociedade Brasileira de Química**, v. 29, n. 2, p. 240 - 247, 2018.

SKOOG, D.A; HOLLER, F.J; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5a. Ed, Bookman, Porto Alegre, 836 pp, 2002.

VALDEZ, H.C.; AMADO, R.S.; SOUZA, F.C.; ELLA, E. Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica, **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 601 - 607, 2012.

VALIULIN, R.A. TÍTULO. 2018. **Malaprade Oxidation**: [ilustração]. EUA.

ZHANG, Y.; DUBE, M.A.; McLEAN, D.D.L.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment, **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 1 - 16, 2003.