

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDA BIF

**CONCEITO DE ANÁLISE EM FRASCO ÚNICO: DETERMINAÇÃO DE FERRO EM
BIODIESEL POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE
REVERSA E DETECÇÃO POR IMAGEM DIGITAL**

MEDIANEIRA

2023

EDUARDA BIF

CONCEITO DE ANÁLISE EM FRASCO ÚNICO: DETERMINAÇÃO DE FERRO EM BIODIESEL POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE REVERSA E DETECÇÃO POR IMAGEM DIGITAL

Single vial analysis concept: determination of iron in biodiesel by reverse-phase dispersive liquid-liquid microextraction and detection by digital image

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologias Ambientais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Professor Dr. Oldair Donizeti Leite.

Coorientador: Professor Dr. Éder Lisandro de Moraes Flores.

MEDIANEIRA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Medianeira**



EDUARDA BIF

CONCEITO DE ANÁLISE EM FRASCO ÚNICO: DETERMINAÇÃO DE FERRO EM BIODIESEL POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE REVERSA E DETECÇÃO POR IMAGEM DIGITAL.

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologias Ambientais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias Ambientais.

Data de aprovação: 10 de Agosto de 2023

Dr. Oldair Donizeti Leite, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Danilo Rodrigues De Souza, Doutorado - Universidade Federal do Oeste da Bahia

Dr. Marcos Andre Bechlin, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 25/09/2023.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira.

Ao Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite pela orientação, paciência e compreensão. Muitíssimo obrigada!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Éder Lisandro de Moraes Flores pelo suporte e orientações no laboratório.

Aos professores e colegas do programa pelas valiosas contribuições em minha formação.

Aos professores Dr. Paulo Rodrigo Stival Bittencourt e Dra. Poliana Macedo Dos Santos pelas contribuições na banca de qualificação.

Aos professores Dr. Marcos Andre Bechlin e Dr. Danilo Rodrigues De Souza pelos apontamentos e sugestões na banca de defesa da dissertação, que muito contribuíram nesta pesquisa.

À minha família pelo apoio incondicional e suporte.

Ao meu amor, pelo amor, respeito, paciência, apoio e tolerância.

À CEANMED – Central Analítica Multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira, Paraná, Brasil, pelos ensaios realizados.

RESUMO

Procedimentos analíticos ambientalmente planejados, miniaturizados e que minimizam erros sistemáticos e aleatórios são de grande interesse na área de química analítica. A análise em frasco único atende estas condições devido a possibilidade de preparo e detecção do analito de interesse em um único frasco e tem o seu efeito potencializado quando associada ao método de preparo de amostras miniaturizado. A presença de metais de transição como o ferro em biodiesel, mesmo em baixas concentrações, pode acelerar o processo de oxidação do biocombustível e provocar redução da vida útil deste, portanto, elaborar métodos alternativos para identificar a presença e quantificar este metal na amostra é fundamental para mitigação de riscos, uma vez que não há em normas brasileiras e estrangeiras a regulação da presença de Fe em biodiesel B100 e, conseqüentemente, indicação dos ensaios analíticos para determiná-lo. Nesta pesquisa, foi desenvolvido um método empregando a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME) visando a extração e pré-concentração de Fe em amostra de biodiesel. A determinação deste metal na amostra foi realizada por aquisição de imagens digitais com calibração feita por fortificação na matriz. Foram investigadas as interferências dos seguintes parâmetros de otimização do método de preparo de amostra: solvente dispersor, proporção entre a solução de solventes dispersor/extrator, tipo de ácido empregado como solvente extrator, pH da solução extratora, concentração do íon SCN⁻, volume da solução de solventes, emprego de radiação ultrassom, temperatura e tempo de centrifugação. Para a etapa de otimização do método, as amostras foram preparadas com adição de padrão organometálico para Fe 100 µg g⁻¹ (Specsol, Brasil). Para escolha do melhor resultado dos parâmetros para determinação de ferro por imagens digitais, os ensaios foram realizados em triplicata e interpretados de acordo com o resultado da norma de vetor, proposto por Lyra e colaboradores (2008). O limite de quantificação do método proposto foi obtido através do valor do primeiro ponto da curva de calibração e o limite de detecção foi calculado a partir do LQ. Os resultados obtidos para LQ e LD foram de 0,5 mg L⁻¹ e 0,15 mg L⁻¹, respectivamente. Os testes de adição e recuperação do método proposto foram realizados por adição de padrão em duas concentrações distintas (0,5 µg g⁻¹ e 3,0 µg g⁻¹) em duas amostras com aditivos e duas sem. Os resultados obtidos foram satisfatórios para as amostras sem aditivo (90 – 96%), em contrapartida, os resultados de recuperação das amostras com aditivos foram ligeiramente inferiores (69 – 78%). Os resultados obtidos por meio do método proposto (RP-DLLME/Imagens digitais) foram comparados com os resultados obtidos por extração induzida por quebra de emulsão (EIQE) e determinado espectrometria de absorção atômica com chama, em cinco amostras de biodiesel (três com aditivos e duas sem). Constatou-se não haver diferença estatística entre os dois métodos (5% de significância). A RP-DLLME destacou-se por utilizar ácido diluídos em volumes mais baixos, pela simplicidade e baixo custo, por possibilitar a realização das etapas de preparo de amostra, reação e determinação em um único frasco, pela redução de etapas e tempo despendido no processo.

Palavras-chave: RP-DLLME; frasco único; ferro; biodiesel; imagens digitais.

ABSTRACT

Environmentally designed, miniaturized analytical procedures that minimize systematic and random errors are of great interest in the field of analytical chemistry. Single vial analysis meets these conditions due to the possibility of preparing and detecting the analyte of interest in a single vial and its effect is enhanced when associated with a miniaturized sample preparation method. The presence of transition metals such as iron in biodiesel, even in low concentrations, can accelerate the oxidation process of the biofuel and cause a reduction in its useful life. Therefore, developing alternative methods to identify the presence and quantify this metal in the sample is essential to mitigate risks, since Brazilian and foreign standards do not regulate the presence of Fe in B100 biodiesel and, consequently, indicate the analytical tests to determine it. In this research, a method was developed using reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME) for the extraction and pre-concentration of Fe in biodiesel samples. The determination of this metal in the sample was carried out by digital image acquisition with calibration carried out by fortification in the matrix. The following parameters were investigated when optimizing the sample preparation method: dispersing solvent, dispersing/extracting solvent solution ratio, type of acid used as the extracting solvent, pH of the extracting solution, SCN⁻ ion concentration, solvent solution volume, use of ultrasound radiation, temperature and centrifugation time. For the method optimization stage, the samples were prepared with the addition of an organometallic standard for Fe 100 µg g⁻¹ (Specsol, Brazil). In order to choose the best result for the parameters for iron determination by digital imaging, the tests were carried out in triplicate and interpreted according to the result of the vector standard, proposed by Lyra et al (2008). The quantification limit of the proposed method was obtained from the value of the first point on the calibration curve and the detection limit was calculated from the LQ. The results obtained for the LQ and LD were 0.5 mg L⁻¹ and 0.15 mg L⁻¹, respectively. The addition and recovery tests of the proposed method were carried out by adding the standard in two different concentrations (0.5 µg g⁻¹ and 3.0 µg g⁻¹) to two samples with additives and two without. The results obtained were satisfactory for the samples without additives (90 - 96%), while the recovery results for the samples with additives were slightly lower (69 - 78%). The results obtained using the proposed method (RP-DLLME/Digital Imaging) were compared with the results obtained by emulsion break induced extraction (EIQE) and determined by flame atomic absorption spectrometry, on five biodiesel samples, three with additives and two without. It was found that there was no statistical difference between the two methods (5% significance level). RP-DLLME stood out for using diluted acids in lower volumes, for its simplicity and low cost, for making it possible to carry out the sample preparation, reaction and determination stages in a single vial, and for reducing the number of steps and time spent on the process.

Keywords: RP-DLLME; single vial; iron; biodiesel fuels; digital images.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de produção de biodiesel por transesterificação	19
Figura 2. Percentual participativo das matérias-primas para a produção de biodiesel brasileiro em 2021.....	20
Figura 3. Os 12 princípios da química analítica verde.....	29
Figura 4. Sistema de aquisição de imagens (A), sistema interno (B) e comparação (C).....	35
Figura 5. Interface da plataforma. (A) Visualização da imagem capturada.	36
Figura 6. Espaço vetorial RGB e o vetor resultante $ v $ representando uma cor.	37
Figura 7.Procedimento RP-DLLME em frasco único empregado em biodiesel.	42
Figura 8.Separação entre as fases orgânicas e aquosa em frasco único.	45
Figura 9. Perfil de resposta dos sinais obtidos com norma (soma R+G+B) e dos canais R, G e B com a variação da concentração de ferro	47
Figura 10.Estudo da área de aquisição da imagem digital. (A) Dimensão selecionada. (B) 0,5 X. (C) Dimensão 1X (selecionada). (D) 2X. (E) 4X e (F) 6X.	48
Figura 11.Estudo da área de interesse para aquisição de imagem.....	49
Figura 12. Efeito do emprego de isopropanol e n-propanol como solventes dispersores.....	50
Figura 13.Efeito do estudo das proporções do solvente dispersor.....	52
Figura 14.Efeito do estudo dos tipos de ácidos para solução extratora.	53
Figura 15.Efeito do estudo do pH para solução extratora.	54
Figura 16.Efeito do estudo da concentração de SCN^- para solução extratora.	56
Figura 17.Efeito do estudo do volume da solução dos solventes dispersor/extrator.	57
Figura 18.Efeito do estudo do uso de ultrassom.	59
Figura 19.Efeito do estudo do controle de temperatura.	60
Figura 20.Efeito do estudo do tempo de centrifugação.	62
Figura 21. Perfil da linearidade de resposta do complexo Fe/tiocianato em diferentes meios reacionais.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Normas técnicas brasileiras e estrangeiras validadas para determinação de contaminantes em biodiesel.	21
Tabela 2. Métodos de extração empregando o RP-DLLME para amostras oleosas distintas, com diferentes analitos e técnicas de determinação.	26
Tabela 3. Parâmetros para aquisição de imagens.	38
Tabela 4. Parâmetros instrumentais para determinação de Fe por F AAS.	44
Tabela 5. Teste de Tukey (5% significância) para análise da diferença das médias de pH.	55
Tabela 6. Teste de Tukey (5% significância) para análise da diferença das médias de [SCN-] mol L ⁻¹	56
Tabela 7. Teste de Tukey (5% significância) para análise da diferença das médias de temperatura.	61
Tabela 8. Condições ótimas para o uso de RP-DLLME como preparo de amostras para determinação de Fe(III) em biodiesel por meio de imagens digitais.	63
Tabela 9. Parâmetros das retas das curvas analíticas.	64
Tabela 10. Comparação entre o desempenho dos testes de recuperação nas curvas analíticas.	65
Tabela 11. Parâmetros de linearidade para ferro (III).	66
Tabela 12. LD e LQ do método proposto.	66
Tabela 13. Recuperação de Fe em 2 níveis de concentração (n=3).	67
Tabela 14. Determinação da concentração de ferro em amostras de biodiesel empregando o RP-DLLME com detecção por imagem digital e por EIQE com detecção por FAAS (n = 3).	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica, do inglês, <i>atomic absorption spectrometry</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de variância, do inglês, <i>analysis of variance</i>
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
CMYK	Ciano, Magenta, Amarelo e Preto, do inglês, <i>Cyan, Magenta, Yellow and Black</i>
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
BDD	Eletrodo de diamante dopado com boro, do inglês, <i>boron doped Diamond</i>
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês, <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
EIQE	Extração induzida por quebra de emulsão
F AAS	Espectrometria de absorção atômica em chama, do inglês, <i>flame atomic absorption spectrometry</i>
GAC	Química analítica verde, do inglês, <i>Green Analytical Chemistry</i>
GC FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, do inglês, <i>gas chromatography with flame ionization detector</i>
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês, <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>
HR CS ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução com atomização eletrotérmica, do inglês, <i>high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry</i>
HSB	Cor, Matiz e brilho, do inglês, <i>hue, saturation and brightness</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP-OES	Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente, do inglês, <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
LD	Limite de detecção

LED	Diodo emissor de luz, do inglês, <i>light emitter diode</i>
LLE	Extração Líquido-Líquido, do inglês, <i>liquid-liquid extraction</i>
LQ	Limite de quantificação
NBR	Normas Brasileiras
PVC	Policloreto de vinila
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
RGB	Vermelho, Verde e Azul, do inglês, <i>Red Green Blue</i>
RP DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa, do inglês, <i>reverse phase dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo, do inglês, <i>relative standard deviation</i>
SD	Desvio Padrão, do inglês, <i>standard deviation</i>
SQT-F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama utilizando sistema de tubo de quartzo com fenda, do inglês, <i>slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrometry</i>
SWASV	Voltametria de redissolução anódica usando onda quadrada, do inglês, <i>square wave anodic stripping voltammetry</i>
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
v/v	Volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

pH	Potencial hidrogeniônico
Fe	Ferro
NaOH	Hidróxido de sódio
KOH	Hidróxido de potássio
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HSO ₃ ⁻	Íon hidrogenossulfito
-R	Radical
Na	Sódio
K	Potássio
Ca	Cálcio
Mg	Magnésio
Cu	Cobre
Zn	Zinco
Ni	Níquel
Cr	Cromo
Pb	Chumbo
Al	Alumínio
Mn	Manganês
Cd	Cádmio
HNO ₃	Ácido nítrico
SCN ⁻	Ânion tiocianato
NH ₄ SCN	Tiocianato de amônio

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
3.1 O Biodiesel no Brasil e no mundo	16
3.2 A produção do biodiesel brasileiro	17
3.3 Presença de metais em biodiesel	20
3.4 Os procedimentos tradicionais de preparo de amostras oleosas	22
3.4.1 Métodos de extração e pré-concentração.....	23
3.4.1.1 Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa	24
3.4.1.2 Extração induzida por quebra de emulsão.....	28
3.5 Análise em frasco único: uma alternativa verde	28
3.6 Determinação de metais de transição em biodiesel	30
3.6.1 Aquisição de imagens digitais e os modelos de cores	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Instrumentação utilizada	33
4.2 Reagentes e materiais	34
4.3 Amostras de biodiesel	34
4.4 Sistema de leitura para aquisição das imagens digitais	35
4.4.1 Tratamento das imagens digitais	37
4.5 Conceito de frasco único utilizado no método proposto	38
4.6 Determinação dos parâmetros de influência do método de RP-DLLME	39
4.6.1 Determinação do solvente dispersor e proporção.	39
4.6.2 Determinação do solvente extrator e pH da solução	40
4.6.3 Determinação da concentração do íon tiocianato	40
4.6.4 Determinação do volume da solução dos solventes dispersor/extrator	40
4.6.5 Avaliação do uso de ultrassom e determinação da temperatura do	
meio reacional	40
4.6.6 Determinação do tempo de centrifugação.....	41
4.7 Protocolo para determinação de Fe em biodiesel por RP	
DLLME/Imagem digital	41
4.7.1 Obtenção da curva de calibração	42

4.8	Figuras de mérito do método proposto	43
4.9	Determinação de ferro em amostras de biodiesel empregando a técnica de extração por emulsão e detecção por FAAS.....	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	Otimização do método analítico proposto para a determinação de ferro em biodiesel	45
5.2	Obtenção das medidas analíticas por imagem digital.....	46
5.3	Otimização dos parâmetros de extração por RP DLLME e formação do complexo ferro tiocianato do método proposto	50
5.3.1	Avaliação do solvente dispersor e proporção	50
5.3.2	Avaliação do solvente extrator e pH da solução extratora.....	52
5.3.3	Avaliação da concentração do íon tiocianato	55
5.3.4	Avaliação do volume da solução de solventes dispersor/extrator ...	57
5.3.5	Avaliação do uso da radiação de ultrassom	58
5.3.6	Avaliação da temperatura.....	59
5.3.7	Avaliação do tempo de centrifugação.....	61
5.4	Condições otimizadas dos parâmetros da RP-DLLME para extração de Fe em biodiesel	62
5.5	Avaliação da linearidade de resposta do complexo de ferro/ tiocianato por imagem digital, em diferentes condições reacionais	63
5.6	Figuras de mérito do método proposto RP-DLLME/Imagens digitais	65
5.7	Determinação de ferro em amostras comerciais de biodiesel.....	67
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXO A - LEI N. 9.610, DE 19 DE FEVEREIRO DE 1998	84

1. INTRODUÇÃO

O biodiesel é um biocombustível pertencente a matriz energética de vários países. Produzido a partir de fontes renováveis e gorduras animais, no Brasil é consumido nas bombas dos postos de combustíveis indiretamente pelo teor presente em óleo diesel que é regulamentado por meio de resoluções da Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis (ANP). Cabe a ANP deliberar e regulamentar sobre as especificações das características físico-químicas do biodiesel e óleo diesel puro e da mistura destes combustíveis a fim de garantir a qualidade do produto aos consumidores.

A presença de metais em biodiesel, mesmo em baixas concentrações, é a maior responsável pela degradação oxidativa e afeta diretamente a qualidade do biocombustível. A determinação de metais em biodiesel é recorrentemente investigada na literatura científica, principalmente para explorar métodos de preparo de amostras alternativos e as técnicas analíticas pertinentes. Nestes estudos, é habitualmente recordado o modo como a complexidade da matriz interfere nas figuras de mérito tais como os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), a exatidão e a precisão dos métodos analíticos e, o quão essencial é a etapa de preparo das amostras para o êxito da determinação das espécies de interesse na matriz.

Nas normas brasileiras, os ensaios de determinação da concentração de metais em biodiesel são realizados por diluição em xileno ou querosene e quantificados por F AAS (NBR 15556) ou determinados de modo simultâneo por ICP OES (NBR 15553). Embora as técnicas analíticas das normas brasileiras possuam elevada especificidade e resultarem em valores satisfatórios para o LQ do método, há algumas desvantagens associadas a estas técnicas, como os custos dos equipamentos empregados, o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos e de ácidos concentrados, e o laborioso processo da etapa de preparo das amostras.

A microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP- DLLME) é um método de preparo de amostras para a determinação de metais em matrizes oleosas que visa superar algumas das limitações dos métodos convencionais de preparo. Nas análises com RP-DLLME são utilizados volumes significativamente menores de solventes e ácidos diluídos. Quanto ao tempo de

preparo do procedimento de microextração, este é mais célere e de menor custo quando comparado aos métodos tradicionais como a digestão ácida em micro-ondas, por exemplo.

A microextração se inicia após a injeção da solução dispersora/extratora (fase aquosa) na amostra orgânica e após a centrifugação, a parte sedimentada contendo os analitos extraídos pode ser analisada por várias técnicas analíticas (F AAS, GF AAS, ICP-OES). Este método é ambientalmente viável em comparação aos métodos tradicionais de abertura de amostras oleosas e quando citado em artigos, em específico para matrizes complexas, é habitualmente associado aos princípios da Química Verde por ser menos nocivo ao meio ambiente e a saúde do operador.

Procedimentos ambientalmente corretos, miniaturizados, que visam minimizar erros das análises ao tempo que mantém a sensibilidade do método analítico, são de grande interesse de desenvolvimento na área de química analítica. Neste sentido, o emprego de um único frasco em procedimentos de análise atende parte dessas expectativas. A possibilidade de **análise em frasco único** integraliza a etapa de preparo e determinação (ou medida analítica) em um único frasco reacional, minimizando problemas decorrentes a contaminação, perdas do analito de interesse bem como da possibilidade de miniaturização dos procedimentos analíticos.

A versatilidade do uso da análise em frasco único em procedimentos analíticos pode ser potencializada a partir da detecção do sinal analítico realizada pelo conceito de análise por imagem digital. As imagens digitais tem sido uma abordagem alternativa na detecção de espécies de interesse, em especial aquelas que apresentam propriedades colorimétricas. Diversos dispositivos podem ser utilizados para aquisição de imagens digitais (como câmeras, *webcams*, *smartphones*, câmeras endoscópicas, etc.).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo o desenvolvimento de um método analítico empregando a RP-DLLME como preparo de amostra para a determinação de ferro em biodiesel por análise de imagens digitais em frasco único.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Elaborar um método analítico alternativo, simples e de baixo custo em frasco único (envolvendo a etapa de preparo de amostra e detecção) para a determinação de ferro em biodiesel, utilizando a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa e detecção por imagem digital.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar os seguintes parâmetros empregados no procedimento de preparo de amostra do método de RP-DLLME: i) solvente dispersor e proporção; ii) solvente extrator e pH do meio; iii) concentração do agente colorimétrico; iv) volume da mistura dos solventes; v) influência da radiação de ultrassom; vi) influência da temperatura e vii) influência do tempo de centrifugação;
- Determinar as figuras de mérito analítica do método proposto;
- Aplicar o método desenvolvido na determinação de Fe em amostras de biodiesel por aquisição de imagem digital;
- Comparar os resultados da análise de ferro em biodiesel do método proposto (RP-DLLME/Imagens digitais) e o método de extração induzida por quebra de emulsão (EIQE) e determinação por espectrometria de absorção atômica com chamas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3.1 O Biodiesel no Brasil e no mundo

A primeira síntese deste biocombustível ocorreu em 1853, feita pelas mãos do cientista Patrick Duffy, foi obtida através do processo de transesterificação de óleos vegetais, antes mesmo da existência de um motor capaz de processar o biodiesel. Somente em 1893, Rudolf Diesel apoiado por iniciativas do governo francês, apresentou ao público durante uma exposição, um pequeno motor de ciclo a diesel que inicialmente deveria ser abastecido com combustível fóssil, entretanto, por uma solicitação do governo em prol da subsistência de suas colônias africanas, acabou sendo abastecido por óleo de amendoim. Embora ambicioso, este projeto foi deixado de lado por questões econômicas, no entanto, Diesel afirmou em relatos que apesar dos óleos vegetais parecerem insignificantes para alimentar um motor na data da apresentação, futuramente, tornar-se-iam tão importantes quanto o petróleo e o carvão (Santana *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2015).

Em consequência da crise do petróleo na década de 70 e os iminentes debates sobre as questões ambientais no final do século passado, emergiu a necessidade de desenvolver pesquisas no âmbito de desenvolver novos combustíveis provenientes de fontes renováveis. Foi na Alemanha, na década de 90, que a produção de biodiesel ganhou proporções comerciais a nível mundial, através de programas de produção de biodiesel a partir de óleo de canola. O país alemão chegou a ser considerado o maior produtor e consumidor de biodiesel do mundo, destacando-se inclusive pelo uso do biodiesel puro em veículos automotores de projetos pilotos, no entanto, nos dias atuais foi desbancado pelas produções de Estados Unidos da América, Indonésia e Brasil (ANP, 2019; EPE, 2022).

Em solo brasileiro, em 2004 foi instituído por meio do Governo Federal o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). Entretanto, a “certidão de nascimento” do biodiesel foi lavrada somente após a assinatura da Lei nº. 11.097 de 13 de janeiro de 2005, cuja qual deliberava sobre o percentual obrigatório, a ser adotado, a partir de janeiro de 2008, de biodiesel acrescido ao volume de óleo diesel comercializado. Nesta primeira etapa de inserção do biodiesel na matriz energética foi estabelecido o acréscimo de 2% ao óleo diesel.

Posteriormente, o percentual de biodiesel foi gradativamente aumentado, tendo os marcos legais a Lei nº. 13.033 de 24 de setembro de 2014, em que o volume poderia variar de 6 a 7% e com a edição vigente da Lei nº. 13.263 de 23 de março de 2016 e a Resolução CNPE nº. 16 de 29 de outubro de 2018, que estabeleceu a ampliação de 8 até 15%. O cronograma do avanço deste percentual, por meio da Resolução nº. 16/2018, estimou que até o ano de 2023, o B15 chegue as bombas para ser amplamente comercializado (CNPE, 2018; ANP, 2019; EPE, 2022).

De acordo com a nota técnica EPE/DPG/SDB/2022/02 da EPE, emitida em agosto de 2022, já foram produzidos no Brasil cerca de 53,8 bilhões de litros de biodiesel oriundo das mais diversas fontes, desde a criação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel no ano de 2005, até dezembro de 2021. Segundo a mesma nota técnica, o setor nacional de produção de biodiesel registrou um total de 53 usinas de produção em dezembro de 2021, situadas em sua maioria nas regiões Centro-Oeste e Sul do país.

3.2 A produção do biodiesel brasileiro

O Brasil é um país pioneiro no uso de biocombustíveis em relação aos demais países do mundo. A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, por meio da Resolução nº. 7 de 19 de março de 2008 definiu, inicialmente, o biodiesel B100 como sendo o combustível derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, capaz de substituir de modo total ou parcial, combustíveis derivados de fontes não renováveis em motores a combustão e na geração de energia. Ainda nesta resolução, é definido a mistura óleo diesel/biodiesel BX como sendo o combustível comercial (100-X%) em volume de óleo diesel, e X% em volume de biodiesel (ANP, 2008).

A Resolução nº 7 foi parcialmente revogada e atualmente, a regente é a Resolução nº. 45 de 25 de agosto de 2014 que, embora similar à resolução parcialmente revogada, alterou sutilmente as definições de biodiesel e a definição da mistura óleo diesel/biodiesel. Esta última definição passou a ser denominada exclusivamente de óleo diesel BX que é definido pela adição de biodiesel ao óleo diesel A (óleo diesel sem adição de biodiesel) no teor vigente

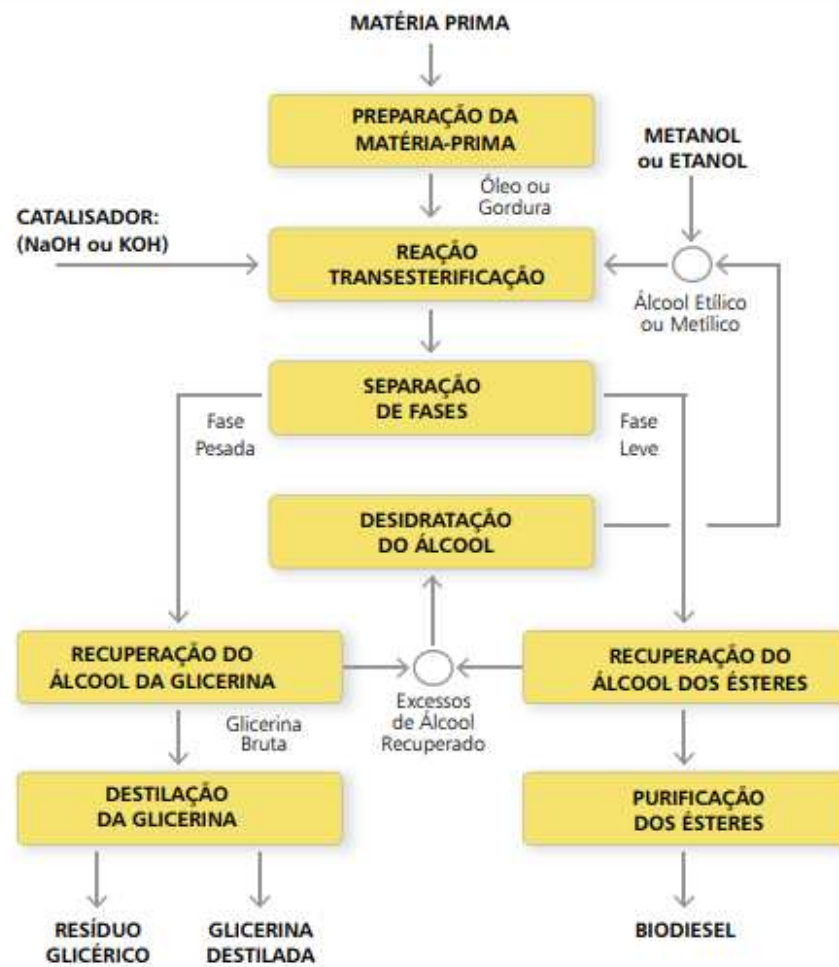
determinado pela legislação, sendo X, o percentual presente de biodiesel B100 na mistura (ANP, 2014).

No que se refere a produção de biodiesel, pode se afirmar que de modo geral é obtido a partir de um processo de transesterificação, oriundo da reação química entre óleos vegetais ou gordura animal com álcool de cadeias curtas, geralmente metanol ou etanol, na presença de catalisador ácido ou básico (Knothe *et al.*, 2006).

Durante a reação de transesterificação o triglicerídeo reage com o álcool simples em excesso. A reação é reversível e pode ser catalisada por bases (NaOH e KOH), ácidos (HCl, H₂SO₄ e HSO₃-R) ou enzimas (lipase), no entanto, a catálise básica homogênea é a mais empregada por gerar menores índices de corrosão nos motores, reduzir o tempo de duração do processo, exigir condições mais amenas de pressão e temperatura tornando o custo da operação mais barato em relação às outras catálises (Aranda *et al.*, 2009).

Por fim, a reação produz ésteres alquílicos de cadeia longa (biodiesel) e glicerol como subproduto. Para a remoção do glicerol são necessários longos tempos de repouso para que ocorra a separação entre as fases e a posterior filtração (Knothe *et al.*, 2006). O fluxo de produção de biodiesel está graficamente apresentado na Figura 1.

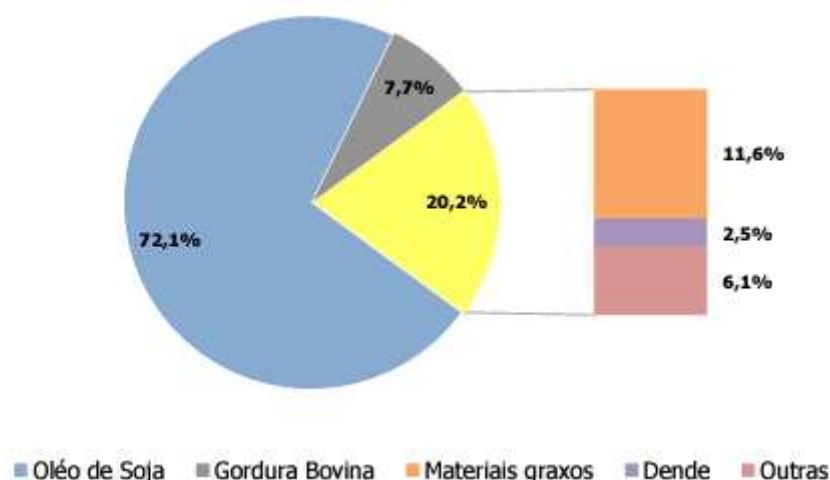
Figura 1. Processo de produção de biodiesel por transesterificação



Fonte: Adaptado de EMBRAPA, Revista Biodiesel (2008)

De todo montante produzido de biodiesel brasileiro em 2021, 4,9 bilhões de litros foram produzidos a partir do óleo de soja, de acordo com estudo realizados pela EPE em parceria com a ANP (EPE, 2022). As matérias-primas e seus respectivos percentuais de uso para a produção estão apresentada na Figura 2.

Figura 2. Percentual participativo das matérias-primas para a produção de biodiesel brasileiro em 2021.



Fonte: Adaptado de EPE, Nota Técnica 3. (2022)

3.3 Presença de metais em biodiesel

A presença de metais em biodiesel é mais comum do que se espera. Parte disso se deve ao fato da reação de transesterificação não possuir o rendimento máximo e, conseqüentemente, promover situações em que os ésteres alquílicos possam estar ligados a outros compostos, incluindo metais (Ramos, *et al.*, 2017).

A presença de metais em biodiesel é desvantajosa por provocar a decomposição e oxidação do biocombustível que podem promover a corrosão em peças do motor dos veículos. Por isso, é necessária uma etapa de purificação do biocombustível com lavagens para separar os produtos reacionais e retirar excessos de reagentes e catalisadores (Knothe; Steidley, 2018).

Dos contaminantes metálicos, as concentrações controladas por normas brasileiras são Na, K, Ca e Mg por estarem presentes nos processos de catálise, lavagem e purificação do biodiesel. Sódio e potássio são utilizados como catalisadores na reação de transesterificação na forma de seus hidróxidos e cálcio e magnésio são empregados na etapa de lavagem na purificação do biocombustível. Ambas presenças no biodiesel, quando acima do permitido, são indesejáveis e podem promover a formação de sabões insolúveis e se depositar em componentes do motor, como as bombas, pistões e bicos injetores, provocando avarias e gastos com manutenção desnecessários. (Sarin *et al.*, 2009; Lyra *et al.* 2010; Lourenço *et al.* 2019)

A presença no biodiesel de metais como Fe, Cu, Zn, Ni, entre outros pode ser justificada pelas etapas de processamento do biocombustível, como o refino, a estocagem, o transporte e a armazenagem. A presença destes metais de transição pode ser igualmente justificada como sendo oriunda do desenvolvimento da própria planta através da absorção destes metais no solo por meio de poluição, pesticidas e fertilizantes (Chaves *et al.*, 2008; Sarin *et al.*, 2009).

No entanto, para estes metais de transição não há norma brasileira ou estrangeira, que regulamenta a concentração máxima permitida no biocombustível, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Normas técnicas brasileiras e estrangeiras validadas para determinação de contaminantes em biodiesel.

Norma	Analito(s)	Técnica analítica
ABNT NBR 15553	Ca, Mg, Na, P e K	ICP OES
ABNT NBR 15554	Na	AAS
ABNT NBR 15556	Na, K, Mg, Ca	AAS
ABNT NBR 15867	S	ICP OES
ASTM D 4951	P e aditivos	ICP OES
ASTM D 5453	S	Fluorescência no ultravioleta
EN 14107	P	ICP OES
EN 14108	Na	AAS
EN 14109	K	AAS
EN 14538	Ca, K, Mg, Na	ICP OES
EN 16294	P	ICP OES
ISO 20846	S	Fluorescência no ultravioleta
ISO 20884	S	Espectrometria de raios-X

Fonte: Autoria própria (2023).

Parte disso se deve ao fato de não existir quantidade significativas destes metais presentes no biodiesel, porém, quando presentes ainda que em níveis de traço, estes metais catalisam e formam radicais livres que reagem com o gás oxigênio formando hidroperóxidos e iniciando a oxidação do biodiesel. A auto oxidação interfere diretamente na qualidade do biocombustível e reduz a vida útil deste (Santos et al. 2019).

Embora ainda não regulamentada em normas específicas, as concentrações para os metais de transição são investigadas pelos pesquisadores por apresentar capacidade em reduzir a estabilidade oxidativa do biodiesel e são consideradas, ainda que em níveis traço, as responsáveis pela catálise da oxidação do biodiesel, implicando na redução do período de indução. (Sarin *et al.*, 2010). Ademais, a presença de metais como Al, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Pb, V e Zn no biodiesel são indesejáveis produtos da combustão deste biocombustível na atmosfera, pois podem ser nocivos à saúde humana (Chaves *et al.*, 2011).

Entre os metais de transição, os que comumente constam como analito de interesse são o cobre, o zinco, o cromo, o níquel, o ferro, o alumínio, o cobalto, o manganês e o chumbo, pelos motivos anteriormente mencionados (Chaves *et al.*, 2011; Takashima *et al.* 2016; Fazal *et al.*, 2017; Antunes *et al.*, 2017; Santos, *et al.*, 2019; Knothe; Steidley, 2019; Dos Santos *et al.*, 2020; Jesus *et al.*, 2021).

3.4 Os procedimentos tradicionais de preparo de amostras oleosas

Dentre as etapas da sequência analítica, a de preparo de amostras tem peso considerável na precisão e exatidão dos resultados, pois é a etapa em que mais ocorrem os erros sistemáticos. Para escolher adequadamente o método de preparo de amostras deve-se considerar as propriedades físico-químicas dos analitos de interesse, a concentração do analito presente na amostra, a complexidade da matriz da amostra e definir qual será a técnica de determinação, para que o preparo esteja compatível a esta técnica (Junior *et al.*, 2019).

Para as técnicas de determinação espectrométricas para análise de matrizes oleosas, os procedimentos habitualmente empregados no preparo das amostras são a calcinação, a extração ácida, a diluição direta em solventes orgânicos, a digestão por micro-ondas e a emulsificação (Souza, 2007).

Embora sejam procedimentos clássicos para determinação de metais nestas matrizes, alguns destes métodos apresentam certas desvantagens relacionadas ao tempo despendido e o labor exigido no desenvolvimento do método. A calcinação, por exemplo, seja em via seca ou em digestão úmida,

apresenta a desvantagem de ser um método trabalhoso e demorado, tendo em vista o tempo necessário para atingir as altas temperaturas necessárias e mantê-las para pirólise da amostra, além de promover alto risco de contaminação e perda de material volátil, assim como a digestão por micro-ondas, que pode também ter baixas frequências analíticas (Souza, 2007).

Os procedimentos de diluição direta com solventes orgânicos, embora seja um método rápido e recomendado por normas técnicas das agências reguladoras, como é o caso da ABNT NBR 15554 para Na, ABNT NBR 15555 para K e ABNT NBR 15556 para Ca e Mg, em que se dilui a amostra em xileno ou querosene para determinação por F AAS, apresenta inconvenientes como oscilação da estabilidade da concentração do analito devido a evaporação do solvente, baixas reprodutibilidades e a toxicidade dos solventes orgânicos utilizados na diluição (Souza, 2007).

A extração ácida, apesar de ser um método simples também pode apresentar obstáculos na execução. A maioria deles relacionados às recuperações incompletas do analito inviabilizando o uso do método para alguns instrumentos de determinação e a morosidade do procedimento. O método da emulsificação, do mesmo modo, pode ser apresentar instabilidade no preparo das emulsões e microemulsões (Souza, 2007).

De acordo com Reis e colaboradores (2018), os métodos tradicionais de preparo de amostras para matrizes oleosas podem ter seus obstáculos e desvantagens contornadas para tornarem-se métodos menos laboriosos, mais breves e mais simples. Neste sentido, novas metodologias de preparo de amostras estão sendo desenvolvidas de modo miniaturizados a partir das já existentes, priorizando a simplicidade e a praticidade ao tempo em que se mantém a qualidade e desempenho do método.

3.4.1 Métodos de extração e pré-concentração

Em consonância aos princípios que abordam o preparo de amostra mais consciente, a metodologia DLLME é compatível a tendência miniaturizada, uma vez que utiliza de volumes reduzidos de solventes orgânicos em comparação ao LLE, conseqüentemente, tornando o processo mais simples e barato. (López-García *et al.*, 2014)

O preparo de amostra por DLLME foi desenvolvido por Rezaee e colaboradores (2006) para determinar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, testando a eficiência de extração com vários solventes extratores. Em resumo, o procedimento desenvolvido consiste na interação entre solvente extrator (apolar, imiscível e mais denso do que a água), solvente dispersor (polar de caráter anfifílico) e a amostra. O processo de preparo de amostra inicia-se após a injeção da mistura de solventes dispersor/extrator à amostra aquosa. O solvente dispersor promove a dispersão de gotas do solvente extrator para que este possa extrair os analitos da amostra de forma eficaz. Posteriormente, após a extração dos analitos pelo solvente extrator, a amostra é submetida à centrifugação. Nesta etapa ocorre a separação entre as fases e os analitos estão depositados na fase sedimentada do solvente extrator. A determinação dos analitos de interesse ocorre a partir da leitura da fase sedimentada que, a depender da técnica analítica para leitura, deve ser preparada adequadamente para esta etapa da sequência analítica (Rezaee; Yamini; Faraji, 2010).

A DLLME tem sido amplamente empregada em amostras aquosas oriundas de matrizes biológicas e alimentares para extração e pré-concentração de analitos metálicos. Embora seja um método rápido, simples e de baixo custo, a DLLME utiliza de solventes extratores organoclorados de elevada toxicidade, que podem interferir na leitura da amostra e ser danosos às técnicas de determinação como ICP OES e ICP MS (Martins *et al.*, 2012).

3.4.1.1 Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa

A RP-DLLME foi proposta por Hashami e colaboradores (2010) inicialmente para sanar a incompatibilidade do solvente orgânico com o HPLC para pré-concentração e extração de oleuropeína em águas residuais provenientes do processamento da azeitona e extrato das folhas de oliveira. Desde então, vêm sendo explorada como método de preparo para amostras oleosas. (López-García; Vicente-Martínez; Hernández-Córdoba, 2014; López-García *et al.*, 2015; Lourenço *et al.* 2019; Kalschne *et al.* 2020; Ferreira *et al.*, 2021; Shishov *et al.* 2022)

A RP-DLLME diferencia-se da DLLME pela alternância da polaridade das partes constituintes, isto é, a amostra apresenta características apolares, enquanto o solvente extrator apresenta características polares. O solvente dispersor deve ter caráter anfifílico, neste caso, habitualmente são empregados álcoois de baixo peso molecular. Em resumo, os analitos são “arrastados” da fase orgânica para fase aquosa para posterior leitura. As demais etapas do procedimento permanecem como as da DLLME. Após a injeção dos solventes, a amostra é submetida à centrifugação para separação das fases e a sedimentada (fase aquosa) é removida para leitura em equipamento adequado (López-García; Vicente-Martínez; Hernández-Córdoba, 2014; Sorouraddin; Farajzadeh; Okhravi, 2020).

A RP-DLLME mantém as vantagens já associadas a DLLME, como a miniaturização do processo, uso de reduzidos volumes de reagentes, valores satisfatórios de fatores de enriquecimento e recuperações, tempo reduzido de preparo e baixo custo em relação à instrumentação, ao tempo que amplia a aplicação do método DLLME para amostras apolares e, neste caso, contorna a desvantagem do uso de solventes orgânicos tóxicos ao empregar solventes mais brandos. (López-García; Vicente-Martínez; Hernández-Córdoba, 2014). O emprego da RP-DLLME em amostras oleosas para posterior determinação em diferentes técnicas analíticas estão elencados na Tabela 2.

Tabela 2. Métodos de extração empregando o RP-DLLME para amostras oleosas distintas, com diferentes analitos e técnicas de determinação.

Analito	Matriz	Mistura de solventes e proporção	Técnica analítica de determinação	Referência
Na, K, Ca e Mg	biodiesel	650 μL de isopropanol e 350 μL de 0,5 mol L^{-1} HNO_3 (v/v)	F AAS	Lourenço e colaboradores (2019)
Na, K, Ca e Mg	biodiesel	585 μL de isopropanol e 195 μL de HNO_3 5% (v/v)	F AAS	Silva (2017)
Cr, Cu e Ni	biodiesel	400 μL de isopropanol e 100 μL de HNO_3 5% (v/v)	GF AAS	Takashima, Chaves e Maranhão (2016)
Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn	Óleo diesel	700 μL de isopropanol e 300 μL de HNO_3 2 mol L^{-1}	ICP-OES	Delpino (2017)
Cd	Óleo de peixe e de oliva	300 μL de n-propanol e 150 μL de água	SQT-FAAS	Ozzeybey e colaboradores (2020)
Cd, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn	Óleo de peixe	700 μL de isopropanol e 300 μL de HNO_3 2 mol L^{-1}	ICP-OES	Kalschne e colaboradores (2020)
Ni/	Gordura vegetal hidrogenada	700 μL de n-propanol e 300 μL de 2 mol L^{-1} HNO_3	F AAS	Kalschne e colaboradores (2020)
Fe, Mg e Zn	Óleos vegetais	500 μL de isopropanol e 500 μL de HNO_3 5% (v/v)	F AAS	Reis (2018)

Pb e Cd	Óleos comestíveis	300 µL de isopropanol e HNO ₃ 3% (v/v)	ET AAS	López-García, Vicente-Martínez e Hernandez-Cordoba (2015)
Cd e Zn	Óleos vegetais	750 µL de DES e 400 µL HNO ₃ 3% (v/v)	F AAS	Sorouraddin, Farajzadel e Okhravi (2020)
Ag, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, S, Se, Sn e V	Gasolina	Agitação por vórtex como sistema de dispersão e 115 µL de HCl 8 mol L ⁻¹	ICP-OES	Vidal e colaboradores (2021)
Fe e Cu	Óleo Mineral Isolante	600 µL de isopropanol e 400 µL de HNO ₃ + HCl (1:1) 1 mol L ⁻¹	F AAS	Wendt (2021)
As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V	Excipientes farmacêuticos oleosos	1000 µL de n-propanol e 1000 µL de HNO ₃ 3 mol L ⁻¹ ou HCl 6 mol L ⁻¹	ICP-MS/ CVG-ICP-M	Andriolli (2021)
Fe e Cu	Óleo Vegetal Isolante	800 µL de n-propanol e 200 µL de HCl 1,5 mol L ⁻¹	F AAS	Tasistro (2022)

Fonte: Autoria própria (2023)

3.4.1.2 Extração induzida por quebra de emulsão

A extração induzida por quebra de emulsão (EIQE) é um método comumente empregado para extração de metais em matrizes oleosas. O método consiste na formação de emulsão através da adição de uma solução extratora aquosa formada por um ácido, habitualmente HNO_3 , e um surfactante, à uma amostra oleosa, mantendo agitação constante e vigorosa, que pode ser manual ou por meio de equipamento para a formação das emulsões. Nesta etapa, a superfície de contato entre a fase orgânica e a fase aquosa (solução extratora) é consideravelmente aumentada, potencializando a extração e o arraste dos analitos para a fase aquosa. (Cassella *et al.*, 2010, 2012, 2018)

Geralmente, a quebra da emulsão ocorre por aquecimento ou centrifugação formando um sistema ternário no frasco em que é possível distinguir nitidamente a fase orgânica, a fase aquosa e a fase aquosa rica em surfactante. Os desafios da lidar com a complexidade da matriz oleosa são superados, uma vez que apenas a fase aquosa rica em analitos é retirada do frasco para análise instrumental. (Cassella *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2013)

O uso deste método foi reportado na literatura para a determinação de metais em várias matrizes oleosas, tais como, óleo mineral (Caldas *et al.* 2014; Cassella *et al.*, 2018); óleo lubrificante (Caldas *et al.*, 2013; He *et al.* 2015); óleo diesel (Cassella *et al.*, 2010, 2012) e gasolina (Leite *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2019).

Para a matriz de biodiesel, pesquisas para a determinação de Cu, Mn, Ni por ET AAS em biodiesel (Pereira *et al.*, 2013) e para a determinação de Ca e Mg em biodiesel por FS FAAS (Pereira *et al.*, 2014), foram realizadas utilizando a extração induzida por quebra de emulsão como preparo de amostras.

3.5 Análise em frasco único: uma alternativa verde

A química analítica verde é uma parte da grande área chamada de química verde. Denominada de GAC, do inglês *green analytical chemistry*, a química analítica verde surgiu no início dos anos 2000 com o objetivo de desenvolver práticas laboratoriais menos prejudiciais ao meio ambiente, de menores riscos operacionais e de menor custo de execução, ao passo que

mantém a qualidade dos resultados obtidos em relação aos métodos referenciais de análise. (Gałuszka; Migaszewski; Namiesnik, 2013). A química analítica verde prioriza o desenvolvimento de processos em que há miniaturização dos métodos já estabelecidos, o uso de fontes renováveis de matéria-prima, o aumento da eficiência energética e a substituição do uso de substâncias tóxicas e bioacumulativas. (Lenardão et al., 2003).

Gałuszka e colaboradores (2013) definiram os 12 diretrizes na forma de princípios para nortear práticas de laboratório mais limpas e ecológicas. Os princípios estão elencados na Figura 3 abaixo.

Figura 3. Os 12 princípios da química analítica verde

Princípio	Descrição
1	Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar tratamento de amostra.
2	A quantidade mínima da amostra e o número mínimo de amostras são ideais.
3	Devem ser realizadas medições <i>in situ</i> .
4	A integração de processos analíticos e operações economiza energia e reduz o uso de reagentes.
5	Métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados.
6	A derivatização deve ser evitada.
7	A geração de um grande volume de resíduos analíticos deve ser evitada e a gestão adequada de resíduos analíticos deve ser fornecido.
8	Métodos multianalíticos ou multiparâmetros são preferidos X métodos que usam um analito de cada vez.
9	O uso de energia deve ser minimizado.
10	Deve-se dar preferência a reagentes obtidos de fonte renovável.
11	Os reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos.
12	A segurança do operador deve ser aumentada.

Fonte: Gałuszka; Migaszewski; Namiesnik, 2013.

A análise em frasco único, que integraliza as etapas de preparo de amostras, microextração e determinação em um único frasco reacional, é um modo de minimizar as desvantagens que os processos miniaturizados apresentam. Os processos miniaturizados, quando aplicados para análises de

traços em reduzidos volumes de amostra, são discutíveis em termos de exatidão, precisão e sensibilidade devido aos erros sistemáticos acumulados das etapas analíticas. Este empecilho pode ser consideravelmente contornado quando o preparo, a reação e a determinação do analito da amostra ocorrem em um único frasco reacional e problemas como contaminações e perda de analitos podem ser igualmente reduzidos ou superados. Em suma, o preparo de amostra em frasco único oportuniza o emprego de menores volumes de reagentes, menor geração de resíduos, menor tempo de execução, menor consumo energético e é condizente aos princípios da química analítica verde. (Anastas; Eghbali, 2010)

3.6 Determinação de metais de transição em biodiesel

Embora inexistam normas técnicas que deliberam sobre a concentração destes metais em biodiesel e tampouco definam a técnica de determinação para estes analitos, nota-se na literatura a preferência pelas técnicas de ICP OES, as de AAS, com atomizadores com chamas e de forno de grafite, e Espectroscopia de Raios X. (Quadros *et al.* 2011; Lobos *et al.*, 2011; Mohammadi *et al.*, 2012; Caldas *et al.*, 2013; López-Garcia *et al.*, 2015.)

3.6.1 Aquisição de imagens digitais e os modelos de cores

Estas técnicas analíticas tradicionais de análise são amplamente empregadas para estudos de metais em biodiesel por apresentar elevada especificidade e atingir níveis baixos de detecção e quantificação, no entanto, os equipamentos são de elevado custo e exigem analistas especificamente qualificados para o manuseio destes equipamentos. Diante destas exigências, técnicas de determinação alternativas foram desenvolvidas visando a praticidade, a sustentabilidade, a facilidade de operação, o baixo custo e a celeridade do processo de determinação, como é o caso da aquisição de imagens digitais e a interpretação das imagens capturadas. (Rezazedh *et al.*, 2019; Böck *et al.*, 2020).

O conceito de imagem digital advém da captura do fenômeno físico do espalhamento e reflexão da luz sobre um objeto e posterior armazenamento em meio digital. A menor unidade de uma imagem digital é chamada de *pixel*, logo,

uma imagem digitalizada de um objeto real inteira é formada por um aglomerado de *pixels*. Após a digitalização da imagem, cada *pixel*, de modo individual, é descrito por uma matriz numérica e armazenado na memória do computador podendo ser interpretada pelos mais variados modelos de cores. (Benedetti *et al.*, 2015)

Embora haja diversos modelos de cores para apresentar uma imagem, tais como CMY e HSB, o modelo mais empregado para o desenvolvimento de métodos analíticos baseado na aquisição de imagens é o modelo RGB (Pacionirk *et al.*, 2006; Benedetti, *et. al.*, 2015). De acordo com esse modelo, todas as demais cores podem ser descritas em combinações distintas das cores primárias vermelho, verde e azul, por isso é chamado de sistema aditivo. Portanto, neste modelo de representação de cores, cada *pixel* é constituído pela interpolação dos valores de RGB resultando em uma cor para cada unidade. Por exemplo, um objeto vermelho terá valores para R maiores à medida que a intensidade do vermelho aumenta, ao passo que, os valores para G e B decrescem proporcionalmente (Passaretti, 2015).

Segundo Benedetti e colaboradores (2015), o modelo de cores RGB é bastante presente no dia a dia da população. A detecção da imagem real pelos olhos humanos baseia-se no modelo RGB de cores, devido aos olhos possuírem células sensíveis a estas três regiões do espectro eletromagnético e interpretarem as cores como uma mistura destas três cores primárias. Segundo a autora, este modelo de cor também é empregado nos tubos de raios catódicos presentes em telas de televisores e computadores, e câmeras digitais.

Na proposta de desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de metais utilizando-se de aquisição de imagens digitais, a análise do sinal analítico interpretado neste modelo de cor é dada pela variação dos valores RGB em relação a cor da reação colorimétrica. Baseando-se na captura de imagens das reações colorimétricas e formação de precipitados coloridos em uma solução através de câmeras digitais, *webcams* ou sensores, é possível desenvolver métodos analíticos correlacionando a intensidade da cor X concentração do analito de interesse. Em outras palavras, é possível construir uma curva analítica a partir dos valores matemáticos obtidos através da captura da imagem e assumir a relação linear entre o sinal analítico e a concentração do analito de interesse na amostra. (Lima *et al.*, 2014).

Sendo assim, presumir que cada concentração do analito na solução é correspondente a um único valor obtido dos padrões de cores RGB é uma forma de tratar estas informações quantitativamente. A interpretação dos resultados obtidos pode ser realizada pela individualização dos canais R, G ou B, sinal analítico de resposta ou ainda utilizar a média dos três canais (Passaretti, 2015; Nogueira, 2016).

A aplicação da técnica de determinação por aquisição de análises digitais associada à criação de métodos analíticos foi utilizada, inicialmente, nos trabalhos de Helfer e colaboradores (2017). Os pesquisadores desenvolveram um aplicativo grátis para *smartphones*, que a partir da captura de imagens das reações colorimétricas através de uma câmera, interpreta os dados capturados por meio de modelos matemáticos univariados e multivariados a partir da interpolação das cores de acordo com o modelo RGB.

O aplicativo já foi utilizado em amostras de biodiesel para determinação da concentração de iodo por meio do procedimento de consumo de iodo pela reação de halogenação com compostos insaturados presentes no biodiesel feito por meio de *spot test* (Soares; Lima; Rocha, 2017) e para determinar biodiesel em *blends* de diesel por meio da formação de um complexo violeta com Fe (III) e o íon hidroxamato através de *spot test* (Soares *et al.*, 2020).

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada junto ao Laboratório de Análise Instrumental e Tecnologia Química (LAITEC), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Medianeira.

4.1 Instrumentação utilizada

Para a etapa de microextração empregada no método de RP-DLLME, as amostras foram pesadas em balança analítica (Marte, modelo AW 220, Brasil) de resolução de 0,0001g e de capacidade máxima de 220g. O preparo das amostras e soluções foram realizadas utilizando micropipetadores (KASVI, modelos K1-P100 e K1-P1000, Brasil) de volumes 10-100 e 100-1000 μL . A etapa de centrifugação das amostras foi realizada em uma centrífuga (Cientec, CT-5000R, Brasil) com capacidade de 12 tubos de 15 mL. O banho de ultrassom foi realizado em potência 70 e frequência 37 Hz (Elmasonic P 60 H, Elma, China).

A determinação dos metais em biodiesel do método proposto foi realizada pelo *software on-line* intitulado de SisGARQ (Sistema de gerenciamento de arquivos de imagem), através da captação de imagens digitais realizadas por uma minicâmera endoscopia (B-MAX) de resolução 640x480 *pixels*, taxa de quadros: 30 fps.

Para a determinação de Fe em biodiesel, na etapa de execução do método de referência, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com chama (Varian, modelo AA 240FS, Austrália), com lâmpada de cátodo oco de acordo com a recomendação do fabricante.

Os registros e tratamentos dos resultados obtidos foram realizados utilizando o *Microsoft Excel*[®]. Para a análise estatísticas para comparação da média entre dois tratamentos de amostras não pareadas foi utilizada o teste T de Student. Para três ou mais tratamentos, foi utilizada a Análise de variância – ANOVA e o teste de Tukey para comparação entre as médias dos tratamentos. Todos os testes estatísticos foram realizados ao nível de 5% de significância.

4.2 Reagentes e materiais

Para os procedimentos de preparo de soluções e lavagem de vidrarias foi utilizada água ultrapura (Gehaka, Brasil) com resistividade inferior a $18,2\Omega\text{ cm}^{-1}$, acoplado com equipamento de sistema de osmose reversa (modelo OS 10 LX, Gehaka, Brasil).

Os materiais e vidrarias utilizados para o método foram devidamente lavados e descontaminados. Inicialmente, foram imersos em solução de detergente neutro a 10% (v/v) (Dinâmica, Brasil) em período determinado por 24 horas. Posteriormente, foram enxaguados por água ultrapura e imersos por igual período em solução de HNO_3 (pureza $\geq 65\%$, Vetec, Brasil) a 10% (v/v), seguidos por novo enxague por água ultrapura. A secagem ocorreu de modo natural em temperatura ambiente (25°C).

Para as etapas de preparo de amostras em frasco único foram utilizados tubos de polipropileno de 15 mL (Falcon, Brasil) de fundo cônico e tampa rosqueada. Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico. O isopropanol (pureza $\geq 95\%$, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e o n-propanol (pureza $\geq 95\%$, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foram utilizados como solventes dispersores. O ácido nítrico (pureza $\geq 65\%$, Vetec, Brasil) e o ácido clorídrico (pureza $\geq 37\%$, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foram utilizados no preparo do solvente extrator. O tiocianato de amônio (Synth, Brasil) foi utilizado como agente colorimétrico ao íon ferro (III).

4.3 Amostras de biodiesel

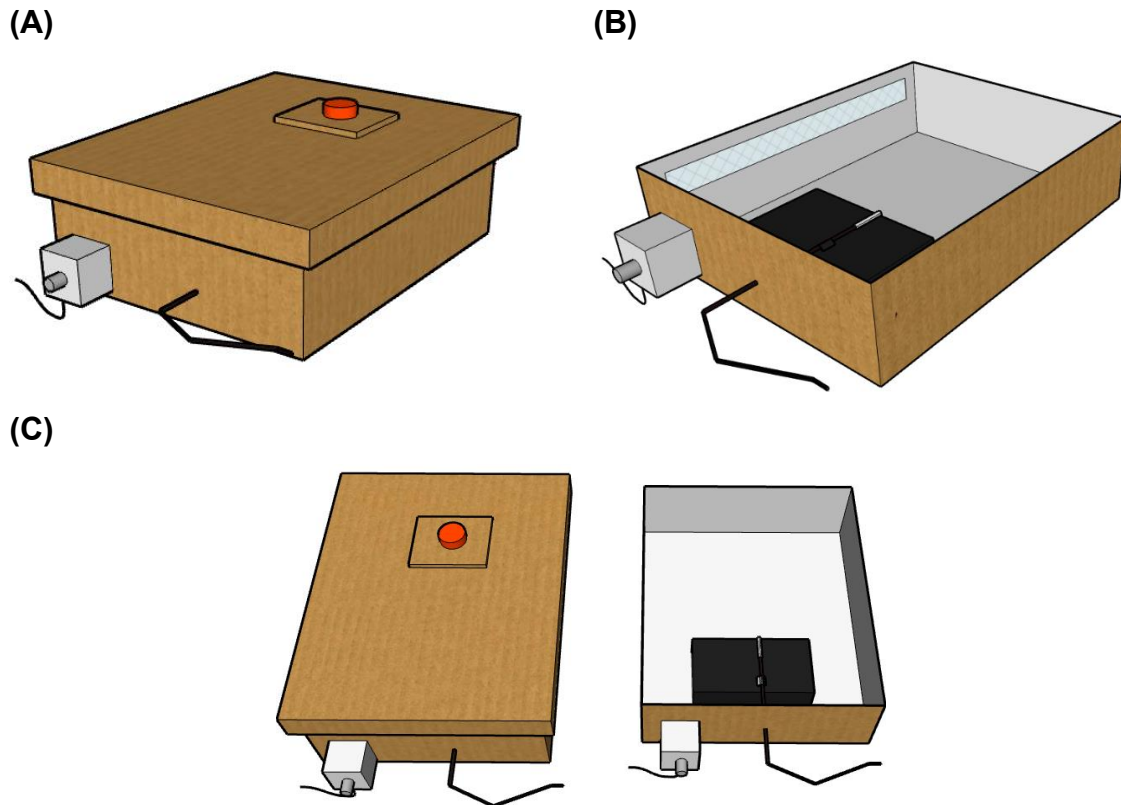
As amostras de biodiesel utilizadas neste trabalho, todas do tipo B100 (100% de biodiesel) foram doadas por empresas: brasileiras do ramo de produção de biodiesel, sendo três amostras sem aditivos e duas com aditivo

Conforme informações fornecidas pelas empresas, as amostras de biodiesel, foram produzidas via processo da reação de transesterificação, preparadas por rota metílica utilizados catalisadores alcalinos, com uma mistura de 70% de óleo de soja e 30% de outras fontes (óleo de fritura e/ou gordura animal - sebo bovino). Porém, as demais características físico químicas do biodiesel não foram fornecidas.

4.4 Sistema de leitura para aquisição das imagens digitais

O sistema físico de leitura, representados na Figura 4, foi construído em laboratório para atender requisitos da leitura, como o controle da luminosidade externa, a fixação por suspensão do tubo sem oscilações de movimento e a distância entre o tubo e a câmera.

Figura 4. Sistema de aquisição de imagens (A), sistema interno (B) e comparação (C).



Fonte: Autoria própria (2023)

O sistema de leitura foi confeccionado em caixa de madeira MDF com tampa do mesmo material, de interior branco (R 255, G 255 e B 255), com iluminação interna realizada por LED branco controlada. Para fixação dos tubos de polipropileno, optou-se por mantê-los suspensos através de um orifício da tampa, fixando-se a distância da câmera e do tubo para a aquisição da imagem. Para a fixação da minicâmera, com porta de saída USB, foi construído um suporte de altura superior ao fundo da caixa de MDF para que a área de captura de imagens da minicâmera mantivesse focada no fundo cônico do tubo de polipropileno. A porta de saída USB da minicâmera foi conectada ao *notebook*

para a leitura da fase aquosa na interface do SisGARQ (Sistema de gerenciamento de arquivos de imagem).

O SisGARQ é uma plataforma *on-line* destinada a aquisição de imagens digitais no modelo RGB de cores e automação de válvulas para analisadores em fluxo de batelada. A interface da plataforma está apresentada na Figura 5.

Figura 5. Interface da plataforma. (A) Visualização da imagem capturada.

Fonte: Autoria própria (2023)

O sistema possibilita que o analista manuseie várias opções de controle e gerencie da forma mais conveniente as funções dispostas na interface. Dentre estas funções habilitadas, **o analista pode**:

- **Gerir o funcionamento das válvulas** – programar o tempo de abertura de cada válvulas, definir os ciclos e renomear, acionar e desativar as válvulas (Figura 5.E);
- **Definir os procedimentos analíticos do método** – obter o diferenciador para as leituras das amostras no modelo de cores RGB (Figura 5.D), escolher o tipo de análise que será executada, que pode ser simples (somente aquisição de imagens) ou completa (aquisição de imagens e funcionamento das válvulas) (Figura 5.F), definir a quantidade de capturas de imagens por segundo, adicionar descrição em cada leitura e iniciar a captura (Figura 5.G)
- **Avaliar os resultados através do Sinal Analítico e dos valores de RGB** – selecionar o instrumento de captura de imagem e calibrá-lo conforme

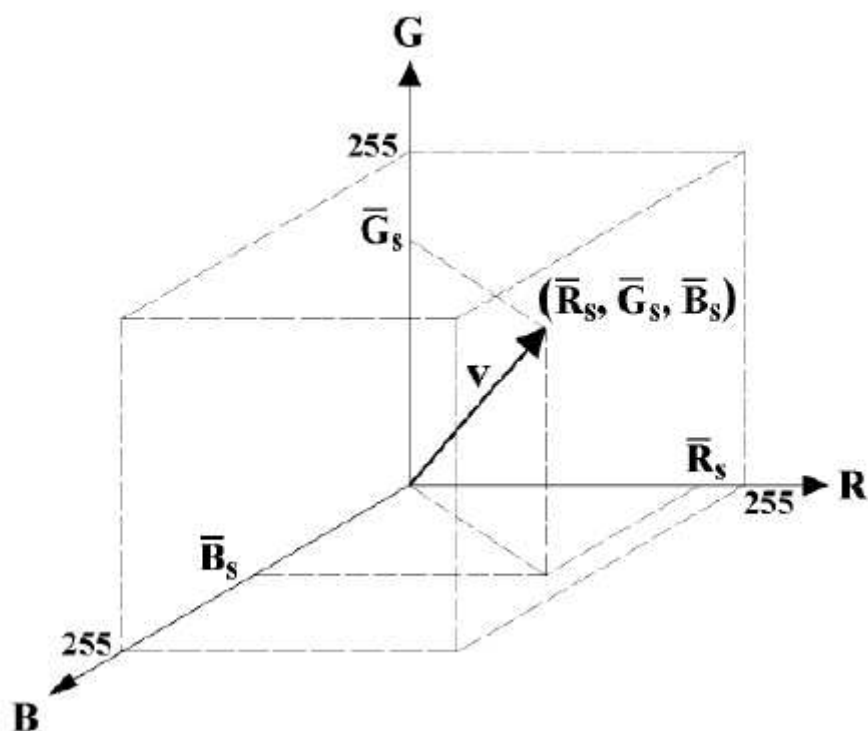
desejar (Figura 5.C), definir a área na amostra de aquisição de imagem (Figura 5.B), realizar a varredura em cada *pixel* e obter as médias dos valores de RGB, descontando o diferenciador na leitura, e conseqüentemente, obter o sinal analítico da interpolação destas componentes de cor para área delimitada de aquisição.

4.4.1 Tratamento das imagens digitais

A partir de seleção da área de interesse para aquisição da imagem, o programa realiza a leitura de cada pixel da área selecionada e armazena para depois decompor a matriz final em valores para R, G e B.

O sinal analítico do método segue o modelo matemático proposto por Lyra e colaboradores (2009), em que se utiliza o conceito da norma de vetor $|\mathbf{v}|$ para associá-lo ao valor da cor, conforme representado na Figura 6:

Figura 6. Espaço vetorial RGB e o vetor resultante $|\mathbf{v}|$ representando uma cor.



Fonte: Lyra e colaboradores (2008)

O cálculo da norma do vetor $|\mathbf{v}|$ baseou-se no modelo matemático utilizado por Lyra e colaboradores (2009), conforme a equação 1.

$$|v| = \sqrt{R^2_{s-b} + G^2_{s-b} + B^2_{s-b}} \quad (1)$$

Em que R^2_{s-b} , G^2_{s-b} e B^2_{s-b} são os valores das médias dos canais RGB das amostras analisadas subtraído as médias dos valores de RGB do branco. No SisGARQ, a leitura do branco analítico ocorre no momento da obtenção do diferenciador antes de realizar a análise da primeira amostra. A plataforma realiza a subtração automaticamente da norma do branco nas demais normas obtidas das leituras das amostras.

Diante destas informações adquiridas, o tratamento dos dados é realizado a fim de evidenciar a relação linear entre a concentração do analito de interesse na fase aquosa e os valores correspondentes obtidos através do sinal analítico. Os parâmetros de leitura na plataforma estão apresentados na Tabela 3:

Tabela 3. Parâmetros para aquisição de imagens.

Parâmetros para aquisição de imagens	
Duração da leitura	5 segundos
Taxa de capturas	1 captura/segundo
Tipo de análise	Simplex
Coordenadas da área de leitura	X ₁ : 279; Y ₁ :239; X ₂ : 305 e Y ₂ :264.
Canal de leitura	Sinal

Fonte: Autoria própria (2023)

4.5 Conceito de frasco único utilizado no método proposto

Os frascos utilizados para o emprego deste conceito foram de tubos de polipropilenos de 15 mL próprios para centrífuga. O conceito de análise em frasco único foi empregado na otimização dos parâmetros da RP-DLLME, na confecção da curva analítica, na aplicação do método proposto nas amostras, bem como nas leituras e aquisição das imagens pela plataforma SisGARQ.

4.6 Determinação dos parâmetros de influência do método de RP-DLLME

Os parâmetros de influência do método foram definidos a partir dos já estabelecidos na literatura científica para RP-DLLME para amostras similares. Nesta pesquisa, os parâmetros definidos para investigação da influência no método RP-DLLME basearam-se nos estudos de Takashima e colaboradores (2016), Silva (2017) e Lourenço e colaboradores (2019) para matriz de biodiesel. Outras pesquisas foram realizadas a fim de verificar quais foram os parâmetros investigados nos trabalhos de Delpino (2017) para óleo diesel; Reis (2018) para óleos vegetais; Wendt (2021) para óleo mineral isolante e Tasistro (2022) para óleo vegetal isolante.

Embasado nestes estudos prévios e considerando a técnica analítica empregada neste trabalho, definiu-se os parâmetros a serem investigados da seguinte forma: tipo e proporção do solvente dispersor (isopropanol e propanol), tipo de ácido e pH do meio para o preparo do solvente extrator (HNO_3 e $\text{HCl} + \text{HNO}_3$ em pH 1, 2 e 3); concentração do íon tiocianato no preparo da solução extratora; volume total da solução dispersora/extratora; tempo de ultrassom, temperatura e tempo de centrifugação.

A condição ideal para cada parâmetro baseou-se na escolha do tratamento que obtivesse o maior sinal analítico para o ensaio. Para os testes visando a otimização do método, as amostras foram confeccionadas para conter $0,6 \mu\text{g g}^{-1}$ do padrão organometálico de ferro na amostra de biodiesel. Definiu-se a massa da amostra fortificada como sendo 5 g em cada tubo de polipropileno para a investigação das condições dos parâmetros. Após a pesagem, a homogeneização ocorreu de forma manual por agitação contínua de 3 minutos. O procedimento de preparo das amostras fortificadas foi realizado diariamente para evitar possíveis erros.

4.6.1 Determinação do solvente dispersor e proporção.

Os solventes dispersores analisados foram o isopropanol e o n-propanol. Nesta etapa, as condições de solução extratora (tipo e concentração de ácido e concentração do íon tiocianato) foram fixadas como: SCN^- 0,6M preparado em HNO_3 , pH 1. Por fim, fixou-se o volume de 2 mL da solução dos solventes

dispersor/extrator na proporção de 50% de dispersor em relação ao volume total da solução.

Após definido o solvente mais adequado ao método, prosseguiu-se para a investigação da proporção mais adequada de solvente dispersor em relação ao volume total da solução. Verificou-se as proporções de 50, 70, e 80%.

4.6.2 Determinação do solvente extrator e pH da solução

Os solventes extratores analisados foram o HNO_3 e $\text{HCl} + \text{HNO}_3$. Nesta etapa foram investigados também o pH ideal para o preparo da solução extratora (ácido + tiocianato). A faixa de pH avaliada foi de 1, 2 e 3.

Para tanto, fixou-se as condições do solvente dispersor (seção 4.6.1) e o volume de 2 mL da solução dos solventes dispersor/extrator.

4.6.3 Determinação da concentração do íon tiocianato

A concentração do íon tiocianato, proveniente do sal de NH_4SCN , parte integrante da solução extratora, foi avaliada nas seguintes definições: 0,6; 0,8 e 1 mol L^{-1} .

Nesta etapa, empregou-se o solvente extrator determinado a partir do item 4.6.3 e o respectivo pH, o solvente dispersor (seção 4.6.1) e o volume de 2 mL da solução dos solventes dispersor/extrator.

4.6.4 Determinação do volume da solução dos solventes dispersor/extrator

Aplicou-se as condições ideais dos parâmetros já investigados na determinação do volume total da solução dos solventes dispersor/extrator. Foram investigados nesta etapa os volumes de 1,0; 1,5 e 2,0 mL.

4.6.5 Avaliação do uso de ultrassom e determinação da temperatura do meio reacional

Aplicou-se as condições dos parâmetros anteriormente definidos. O estudo da interferência do uso de ultrassom na metodologia proposta sucedeu-se variando o tempo de permanência dos frascos no banho (0, 5 e 10 minutos). Fixou-se para estes fins a frequência (37 KHz), a potência (70) e a temperatura do banho ($30 \text{ }^\circ\text{C}$).

A influência da temperatura foi investigada nas condições de aquecimento de temperatura ambiente, 50 e 70 °C.

4.6.6 Determinação do tempo de centrifugação

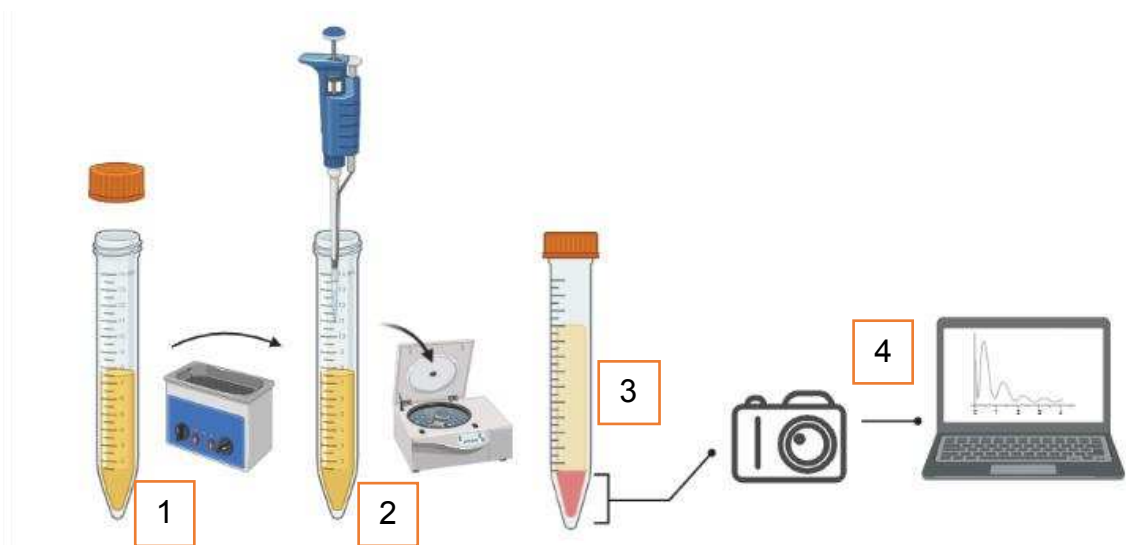
Aplicou-se as condições dos parâmetros anteriormente definidos. A determinação do tempo de centrifugação foi avaliada nas quantidades de 5, 10 e 15 minutos. Para tanto, fixou-se as demais condições do equipamento (rotação 4500 rpm, aceleração 40 s, frenagem 60 s e temperatura de 25 °C).

4.7 Protocolo para determinação de Fe em biodiesel por RP DLLME/Imagem digital

Após as investigações realizadas e dos resultados obtidos, otimizou-se o procedimento da seguinte forma: pesou-se 5 g de amostra fortificada em frascos de polipropileno (1) e submeteu-se ao aquecimento a temperatura de 50 °C em banho-maria por 15 minutos. Depositou-se os frascos em estantes e acrescentou-se à amostra 1,5 mL da solução dispersora/extratora (isopropanol/ SCN^- 0,8 mol L⁻¹ em HNO₃, pH 2) na proporção de 70/30% (v/v), respectivamente (2), em seguida, agitou-se manualmente os frascos por um minuto. Os frascos foram levados à centrifugação com duração de 10 minutos.

Após o término da centrifugação, verificou-se a formação da mistura heterogênea bifásica (3) caracterizando o fim do procedimento de RP-DLLME em frasco único. Em seguida, realizou-se as leituras da fase aquosa para determinação por imagens digitais no mesmo frasco (4). O procedimento foi ilustrativamente retratado na Figura 7.

Figura 7. Procedimento RP-DLLME em frasco único empregado em biodiesel.



Fonte: Autoria própria (2023).

4.7.1 Obtenção da curva de calibração

A curva analítica para calibração é uma representação gráfica de suma importância para quantificar o analito de interesse na amostra através das correlações quase sempre lineares entre o sinal analítico e a concentração do analito.

Dois procedimentos para a obtenção da curva analítica foram avaliados. O primeiro consistiu na fortificação da amostra de biodiesel com padrão organometálico de ferro. Três (3 g) de amostras foram fortificadas, para obtenção de concentrações finais de 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0 mg L⁻¹, respectivamente, após procedimento de extração e reação com 1,5 mL da solução dispersora/extratora (isopropanol/SCN⁻ 0,8 mol L⁻¹ em solução de HNO₃, pH 2) na proporção de 70/30% (v/v). O branco analítico deste procedimento foi produzido sem a adição de padrão de ferro na amostra.

A segunda curva analítica foi feita por padrão externo, a partir da diluição apropriada de uma solução padrão de Fe³⁺ 250 mg L⁻¹: (cloreto de ferro (III) hexahidratado (FeCl₃.6H₂O, massa molecular 270,33 g mol⁻¹), solução dispersora/extratora (isopropanol/SCN⁻ 0,8 mol L⁻¹ em sol. de HNO₃, pH 2) na proporção de 70/30% (v/v), para se obter concentrações finais de 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0 mg L⁻¹, respectivamente. O branco analítico neste caso foi a solução dispersora/extratora.

4.8 Figuras de mérito do método proposto

Os parâmetros de desempenho foram testados conforme sugere o documento orientativo DOQ-CGCRE-008, Revisão 09 de Junho de 2020 emitido pelo Inmetro. Para o método proposto foram aplicados os testes de definição de exatidão, de precisão, de limite de detecção e de limite de quantificação.

Para os testes de exatidão da metodologia proposta, foram realizados ensaios de recuperação na amostra contendo quantidades conhecidas de analito. Os testes foram feitos em triplicata utilizando a equação 2. Para os ensaios de precisão foram analisados os desvios padrões relativo das replicatas do método de recuperação.

$$\text{Recuperação em \%} = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100 \quad (2)$$

Em que:

C1 é a concentração do analito na amostra fortificada;

C2 é a concentração de analito na amostra não fortificada;

C3 é a concentração de analito adicionado à amostra fortificada.

Para o cálculo do limite de detecção e do limite de quantificação do método desenvolvido empregando RP-DLLME e aquisição de imagens digitais, seguiu-se a orientação do Inmetro (2020) para adotar o primeiro da curva analítica como o valor de LQ e, a partir deste valor para LQ, calcular o LD através da equação 3:

$$LD = \frac{LQ}{3,3} \quad (3)$$

4.9 Determinação de ferro em amostras de biodiesel empregando a técnica de extração por emulsão e detecção por FAAS.

Neste trabalho, foi empregado um procedimento adaptado, proposto por Caldas e colaboradores (2013) para a formação de emulsão para a determinação de cobre em petróleo. Neste protocolo, em 3 g de biodiesel foram adicionados

1,0 mL de uma solução contendo 30% v/v de HNO₃ e 5% m/v de TWEEN 20. Na sequência, a mistura foi homogeneizada, em vórtex por 5 min, no qual foi observado a formação de uma emulsão. As emulsões foram então aquecidas em banho maria (80 a 90 °C) até a quebra da emulsão (aproximadamente 2h) e, a formação de duas fases. A fase aquosa foi então cuidadosamente recolhida (aproximadamente 1 mL), avolumado a 2 mL com solução a 0,5% de HNO₃ e, realizada a determinação por FAAS.

Os parâmetros instrumentais utilizados nas medidas de F AAS estão apresentados na Tabela 4:

Tabela 4. Parâmetros instrumentais para determinação de Fe por F AAS.

Parâmetro	Fe
Gás combustível	Acetileno
Gás oxidante	Ar comprimido
Comprimento de onda (nm)	248,3
Fenda espectral (nm)	0,2
Corrente da lâmpada (mA)	5,0
Vazão de ar (L min ⁻¹)	2,0
Vazão de acetileno (L min ⁻¹)	13,5

Fonte: Autoria própria (2023)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

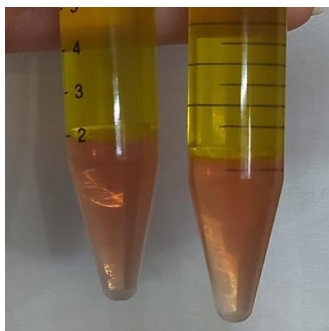
5.1 Otimização do método analítico proposto para a determinação de ferro em biodiesel

Os parâmetros investigados nos estudos de Lourenço e colaboradores (2019), Silva (2017) e Takashima e colaboradores (2016), para aplicação do método de microextração por RP-DLLME em biodiesel serviram de base para a definição dos parâmetros de influência nesta pesquisa. Comum aos três trabalhos, os fatores de influência reportados foram: a temperatura de extração; a massa de amostra; o volume da solução extratora, a concentração da solução extratora, e dispersora, tipo e proporção entre os solventes, uso de ultrassom e tempo de centrifugação.

A partir de ensaios preliminares realizados empregando o método de microextração por RP-DLLME, e considerando os estudos reportados acima, definiu-se as variáveis de influência como sendo as mencionadas anteriormente comum aos três trabalhos. Neste estudo em especial, para determinar ferro por imagens digitais, convém investigar também a influência da concentração do agente complexante, neste caso, o tiocianato, na solução extratora.

Todos os ensaios realizados na otimização do método de microextração proposto foram realizados com adição de padrão organometálico de ferro (Specsol, Brasil). A Figura 8 mostra a separação das fases que evidencia o êxito e conclusão do método de preparo de amostra por RP-DLLME, após a centrifugação. É possível distinguir nitidamente a fase orgânica na parte superior, da fase aquosa, rica em complexo de ferro (III), na parte inferior.

Figura 8. Separação entre as fases orgânicas e aquosa em frasco único.



Fonte: Autoria própria (2023)

A análise em frasco permite que todas as etapas da sequência analítica ocorram em um único frasco reacional. A Figura 8 demonstra a situação do frasco pronto para realização da leitura, ou seja, não há necessidade de extração da fase aquosa, rica em complexos de ferro, para prepará-la para o equipamento de leitura, porque a análise em frasco único permite que a etapa de preparo, reação de complexação e determinação, ocorra em um único tubo de polipropileno. Portanto, a técnica analítica do método proposto foi estrategicamente selecionada para que fosse possível a determinação de ferro com uso da RP-DLLME em frasco único, sem a necessidade do pré-tratamento para a leitura da fase aquosa.

Neste sentido, tão importante quanto a eficiência no procedimento de microextração e formação de complexo de ferro em frasco único, é a obtenção do sinal analítico do complexo formado via aquisição de imagem digital. Na sequência, os resultados obtidos na determinação do complexo de ferro por imagem digital são apresentados.

5.2 Obtenção das medidas analíticas por imagem digital

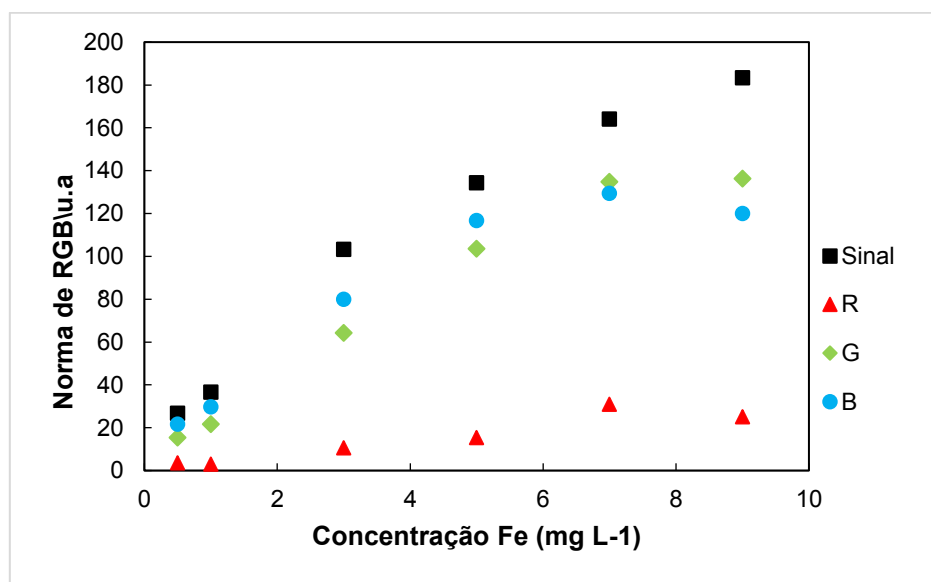
Conforme mencionado por Passaretti (2015), o desenvolvimento de métodos analíticos utilizando a aquisição de imagens digitais como técnica analítica pode ser realizado de várias maneiras. A depender do método desenvolvido, o sinal obtido a partir da leitura da amostra pelo equipamento, pode ser interpretado de forma global, pelo sinal analítico, ou ainda, pela individualização dos canais que compõem o modelo de cor, neste caso, RGB.

Em complemento a ideia de individualização de canais, convém resgatar que todo *pixel* colorido em uma imagem digitalizada é descrito por combinações das componentes R, G e B. Por exemplo, a cor branca tem os valores para as componentes R 255, G 255 e B 255, em contrapartida, a cor preta possui os valores para as componentes R 0, G 0 e B 0. As demais cores entre as extremidades Branco e Preto são constituídas por diversas combinações distintas dos valores para RGB. Os métodos analíticos que utilizam do modelo RGB de cores para obter os dados da leitura, podem optar por selecionar os canais individualizados como a resposta analítica do instrumento, visto que o

princípio da análise por imagens digitais visa relacionar diretamente a intensidade da cor com a concentração do analito na amostra.

Neste sentido, para definir o canal utilizado para otimização do método proposto neste estudo, realizou-se ensaios analisando o comportamento das componentes R, G, B e o sinal analítico, conforme consta na Figura 9. Os ensaios foram feitos por fortificação na matriz. Este gráfico apresenta a curva de calibração decompostos em R, G e B e o sinal analítico nas concentrações de 0,5 mg L⁻¹; 1,00 mg L⁻¹; 3,00 mg L⁻¹; 5,00 mg L⁻¹; 7,00 mg L⁻¹ e 9,00 mg L⁻¹.

Figura 9. Perfil de resposta dos sinais obtidos com norma (soma R+G+B) e dos canais R, G e B com a variação da concentração de ferro



Fonte: Autoria própria (2023)

O complexo formado pelo íon tiocianato e o ferro tem coloração vermelha, que se intensifica conforme maior disposição de ferro na amostra. Para os canais Sinal, G e B, observou-se uma correlação linear de $R^2 > 0,9$, ou seja, cerca de 90% dos pontos das componentes podem ser justificados de acordo com as variações de concentração do analito dentro do intervalo proposto.

A escolha do canal para o método considerou a maior correlação linear obtida, neste caso, a obtida com o canal sinal analítico ($R^2 = 0,96$). No entanto, não se pode deixar de perceber as correlações para o canal G e o canal B, pois ambos os canais são potencialmente promissores para uso como parâmetro para curva de calibração, otimização e validação do método, especialmente o

canal G, visto que o verde é a cor complementar do vermelho no círculo cromático. Todavia, considerando os efeitos da matriz na leitura das amostras optou-se por selecionar o canal Sinal analítico para as investigações posteriores, por ter apresentado maior correlação linear em relação aos demais canais.

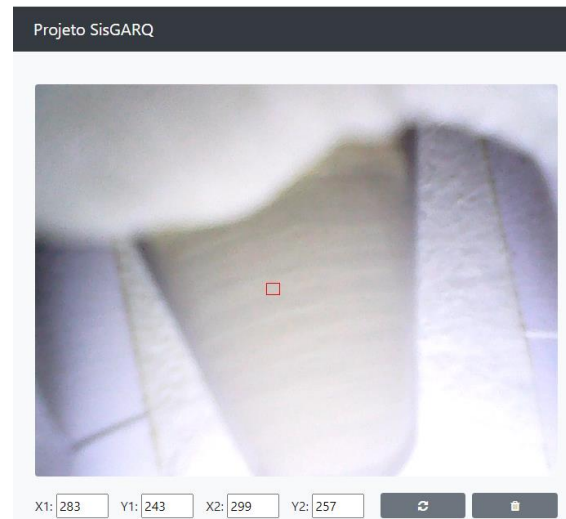
Definido o canal a ser utilizado para os demais ensaios envolvendo a otimização do método, investigou-se interferência da área da aquisição da imagem digital nos dados obtidos a partir da leitura. A Figura 9 mostra o estudo realizado para área de aquisição de imagem:

Figura 10. Estudo da área de aquisição da imagem digital. (A) Dimensão selecionada. (B) 0,5 X. (C) Dimensão 1X (selecionada). (D) 2X. (E) 4X e (F) 6X.

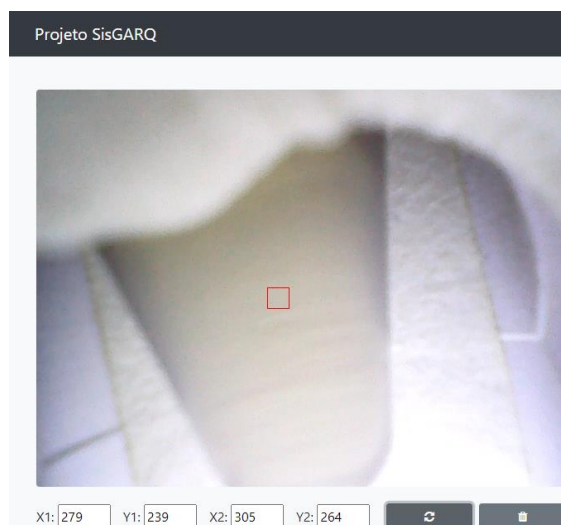
(A) Utilizada na pesquisa



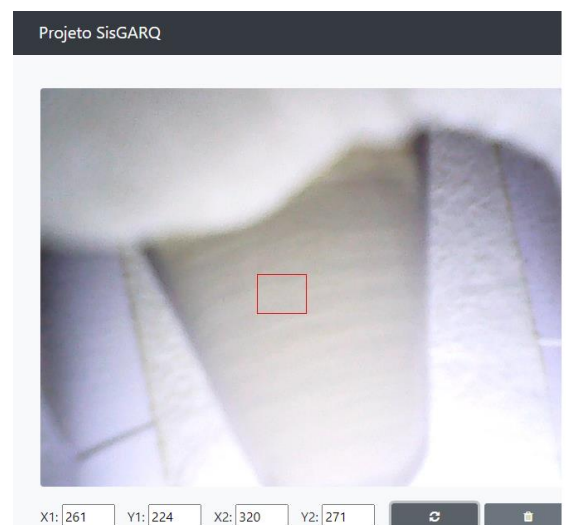
(B) Dimensão 0,5X



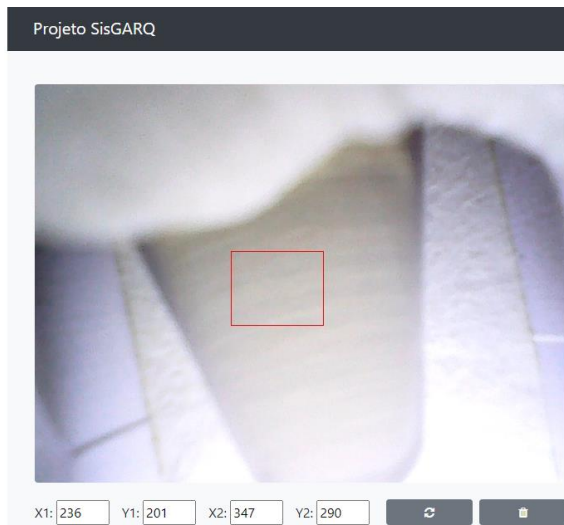
(C) Dimensão 1X (posteriormente selecionada)



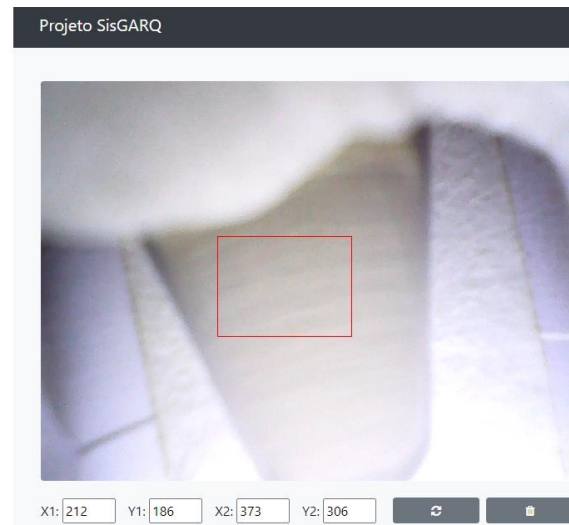
(D) Dimensão 2X



(E) Dimensão 4X



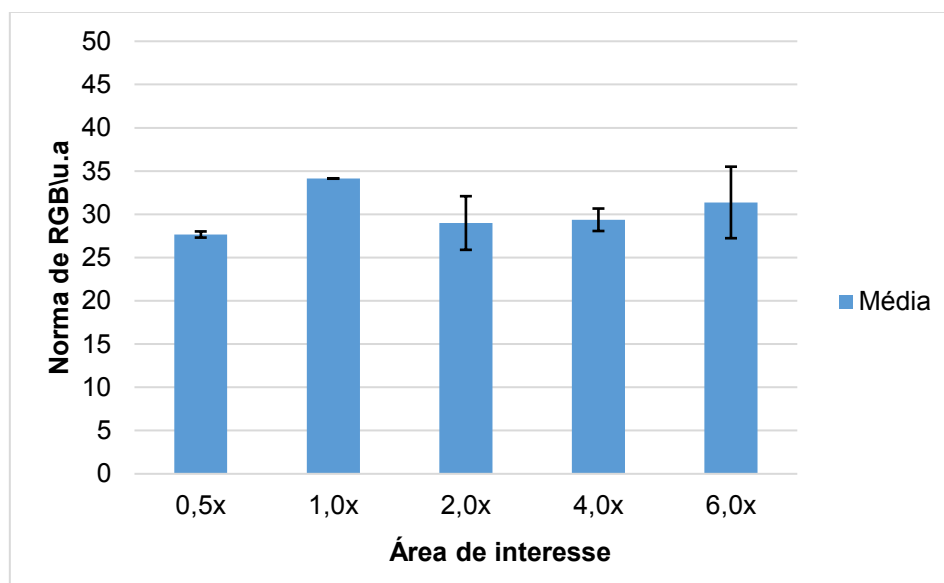
(F) Dimensão 5X



Fonte: Autoria própria (2023)

Para a escolha da área de aquisição foi feita uma amostra fortificada com o padrão orgânico metálico de ferro, para conter $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ferro (III). As leituras foram realizadas em triplicata nesta concentração. De posse dos valores obtidos da leitura, foi realizado o tratamento estatístico entre as médias dos sinais analíticos ao nível de 5% de significância. Os resultados estatísticos estão apresentados na Figura 11 abaixo:

Figura 11. Estudo da área de interesse para aquisição de imagem.



Fonte: Autoria própria (2023)

Ao analisar a variância estatística entre as médias, verificou-se não haver diferença estatística no intervalo de 5% de significância entre as proporções (p -valor $\gg 0,05$), isto porque há uma grande probabilidade de que a diferença observada entre os grupos seja ao acaso. Portanto, a condição da Figura 11.A, por ter apresentado menor desvio padrão, foi a área definida para a otimização do método e demais ensaios comparativos.

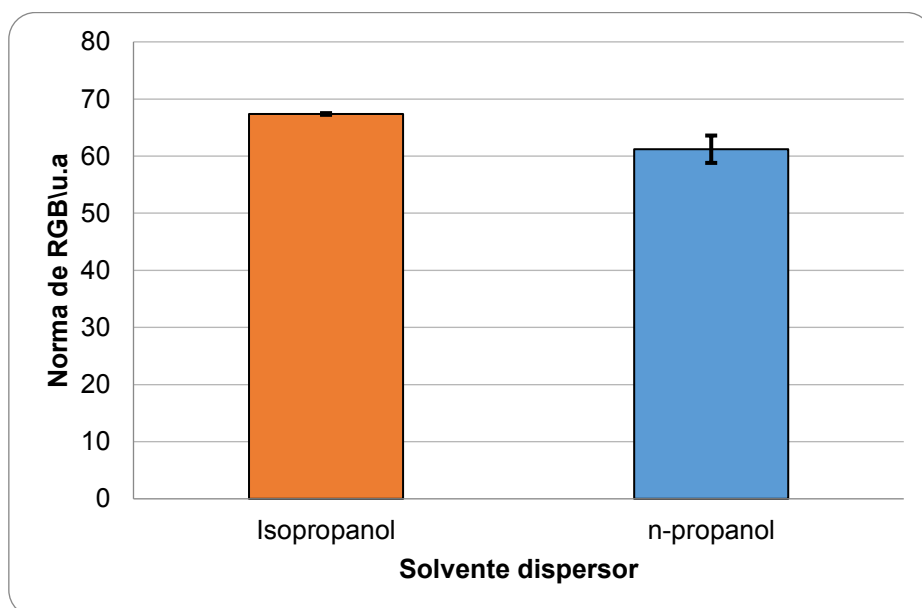
5.3 Otimização dos parâmetros de extração por RP DLLME e formação do complexo ferro tiocianato do método proposto

A escolha da melhor condição dos parâmetros para otimização do método baseou-se no maior sinal analítico obtido para cada parâmetro. Selecionadas as melhores condições, testes de recuperação foram aplicados para obter as figuras de mérito do método.

5.3.1 Avaliação do solvente dispersor e proporção

A escolha do tipo de solventes (isopropanol e n-propanol) embasou-se nos trabalhos de RP-DLLME estudados para amostras oleosas e analitos metálicos (Ver Tabela 1). Os resultados dos sinais analíticos estão apresentados na Figura 12.

Figura 12. Efeito do emprego de isopropanol e n-propanol como solventes dispersores.



Fonte: Autoria própria (2023)

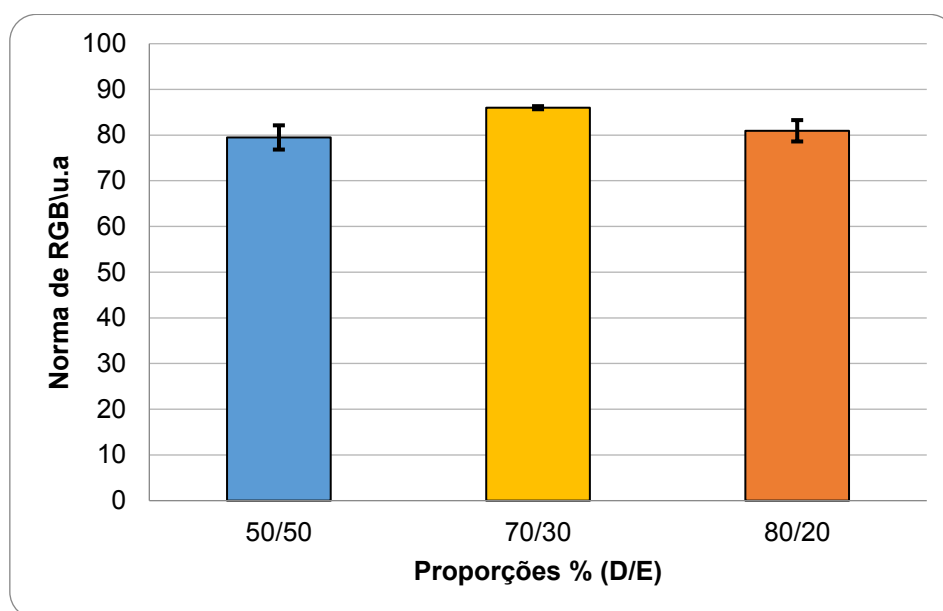
Em uma análise inicial, constatou-se que o uso do solvente isopropanol obteve maior valor para os sinais analíticos em detrimento ao uso do n-propanol. Analisando estatisticamente, constatou-se não haver diferença ao nível de 5% de significância entre as médias dos solventes dispersores.

A escolha do solvente dispersor baseou-se nos valores de desvio padrão para cada solvente e foi amparada pela recomendação da literatura científica estabelecida para a matriz de biodiesel nos trabalhos de Lourenço e colaboradores (2019), Silva (2017) e Takashima e colaboradores (2016). Portanto, optou-se por escolher o isopropanol para prosseguir nas demais etapas da otimização.

O volume adequado de solvente dispersor é fundamental para a microextração eficiente. Para matriz de biodiesel, as pesquisas investigam a influência da proporção a partir da taxa superior a 50% do volume total, tendo em vista a necessidade de que a dispersão seja efetiva para a formação de solução turva e microgotas e, conseqüentemente, permitir que a pré-concentração do analito na fase sedimentada seja a maior possível (López-García; Vicente-Martínez; Hernández-Córdoba, 2014).

Lourenço e colaboradores (2019) empregaram o volume de 650 μL de isopropanol para solução dispersora/extratora final de 1 mL, sendo a proporção do método otimizado 65/35% para biodiesel. Silva (2017) trabalhou com o volume de isopropanol para matriz de biodiesel no valor de 585 μL , sendo a taxa de proporção entre os solventes dispersor e extrator 75/25%. Takashima e colaboradores (2016), no entanto, definiram como ótima a taxa para a matriz de biodiesel na relação 80/20% solvente dispersor/solvente extrator.

No parâmetro proporção deste presente trabalho, embasado nas taxas de proporção dos trabalhos já publicados na literatura científica, foram investigadas as constantes na Figura 13. Houve formação de solução turva e microgotas para todas as proporções investigadas.

Figura 13. Efeito do estudo das proporções do solvente dispersor.

Fonte: Autoria própria (2023)

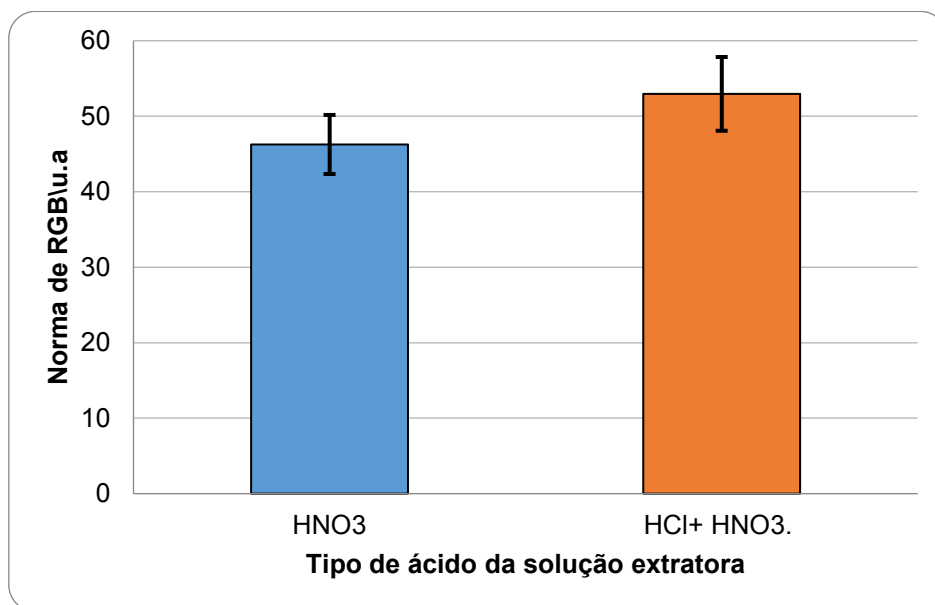
Em uma análise inicial, as médias dos sinais analíticos para os três tratamentos foram próximas umas das outras, sendo a proporção 70/30% a de maior sinal analítico. Ao analisar a variância estatística entre as médias, verificou-se não haver diferença estatística no intervalo de 5% de significância entre as proporções (p -valor $> 0,05$). Portanto, adotou-se a proporção 70/30% de solvente dispersor/extrator devido ao menor desvio padrão apresentado. Nos testes seguintes, empregou-se esta proporção para verificar os demais parâmetros.

5.3.2 Avaliação do solvente extrator e pH da solução extratora

A investigação da natureza do ácido a ser utilizado para o preparo do solvente extrator e a concentração (ou seja, o pH) baseou-se em estudos realizados anteriormente. O ácido comumente utilizado para extração no método RP-DLLME é o HNO_3 , devido ao seu alto poder oxidante, que pode levar a maiores recuperações, entretanto, a influência da adição de HCl a alíquota de HNO_3 foi também investigada.

Os tipos de ácido a ser utilizado para a preparação da solução extratora considerados foram HNO_3 e $\text{HCl} + \text{HNO}_3$. Os sinais analíticos para cada ácido estão apresentados na Figura 14.

Figura 14. Efeito do estudo dos tipos de ácidos para solução extratora.



Fonte: Autoria própria (2023)

Ambos foram considerados eficientes para a RP-DLLME, proporcionando a formação da solução turva e posterior extração para fase aquosa. Embora a mistura entre os ácidos HCl+ HNO₃ tenha obtido o maior sinal analítico nos ensaios, a diferença constatada entre o sinal analítico obtido pelas análises usando HNO₃ não é significativo no intervalo de confiança delimitado de 95%, já que não houve diferença estatística entre as médias dos dois tratamentos.

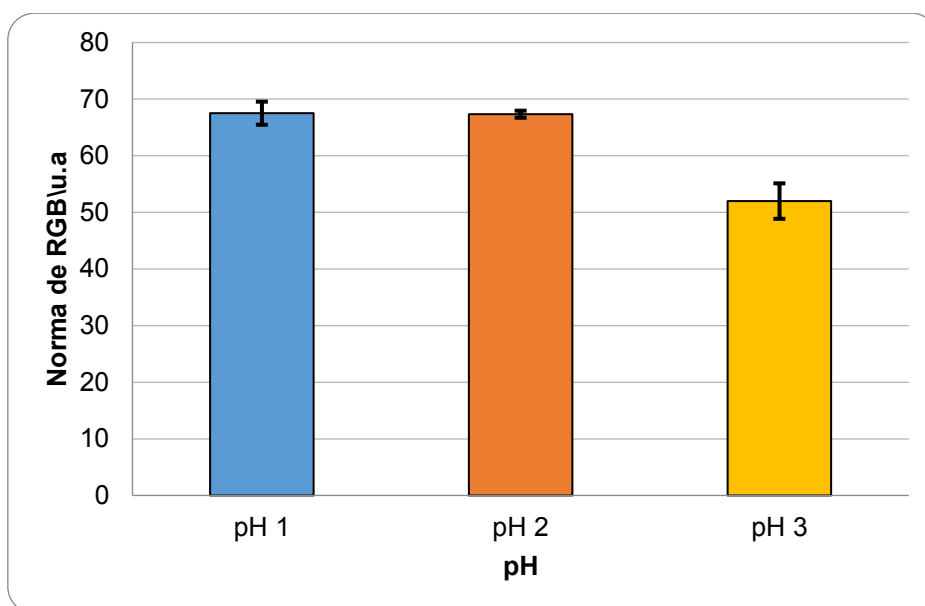
Portanto, a escolha do ácido embasou-se nas pesquisas publicadas para a matriz de biodiesel, tendo em vista as satisfatórias recuperações quando utilizado o HNO₃ como ácido extrator do método. Lourenço e colaboradores (2019) assumiram este ácido como solvente extrator em sua pesquisa sem testar demais possibilidades, haja vista o consolidado papel do ácido nítrico como solvente extrator nas pesquisas que envolvem a RP-DLLME. Silva (2017) optou por utilizar o ácido nítrico em sua pesquisa ao investigar a microextração de metais alcalinos e alcalino terrosos nas mais variadas matrizes de biodiesel. Takashima e colaboradores (2016) utilizaram o ácido nítrico na RP-DLLME do método proposto devido ao alto poder oxidante deste ácido e por ser considerado um eletrólito forte. É possível notar nas demais pesquisas cujas matrizes são oleosas e utilizaram do método RP-DLLME como preparo de amostra, a preferência pelo ácido nítrico como solvente extrator (López-García; Vicente-

Martínez; Hernandez-Cordoba, 2015; Delpino, 2017; Reis, 2018; Ozzeybey et al, 2020; Kalschne et al., 2020; Sorouraddin; Farajzadel; Okhravi, 2020). Portanto, nos demais ensaios dos parâmetros seguintes foi utilizado para o preparo da solução extratora o HNO_3 .

Determinado o ácido a ser utilizado, investigou-se a influência da variação do pH no sinal analítico do método proposto aliada a técnica analítica de aquisição de imagens. A princípio, a função do ácido no RP-DLLME é promover a extração do analito de interesse e para as técnicas analíticas de AAS e ICP-OES as concentrações otimizadas de HNO_3 foram superiores a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, conforme já apresentados na Tabela 2.

Foram investigados os pH de 1, 2 e 3 e os resultados dos sinais obtidos foram tratados na Figura 15.

Figura 15. Efeito do estudo do pH para solução extratora.



Fonte: Autoria própria (2023)

Aplicou-se a ANOVA para verificar se houve diferença estatística no intervalo de 5% de significância entre as médias de cada grupo e constatou-se o $p\text{-valor} < 0,05$, o que confirma a diferença entre as médias em pelo menos um dos tratamentos. Considerando esta diferença, aplicou-se o Teste de Tukey para diferenciá-las. Os resultados estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5. Teste de Tukey (5% significância) para análise da diferença das médias de pH.

pH	Norma RGB (u.a)
1	67,52 ± 3,02 a
2	67,34 ± 0,92 a
3	51,99 ± 6,02 b

Fonte: Autorial própria (2023)

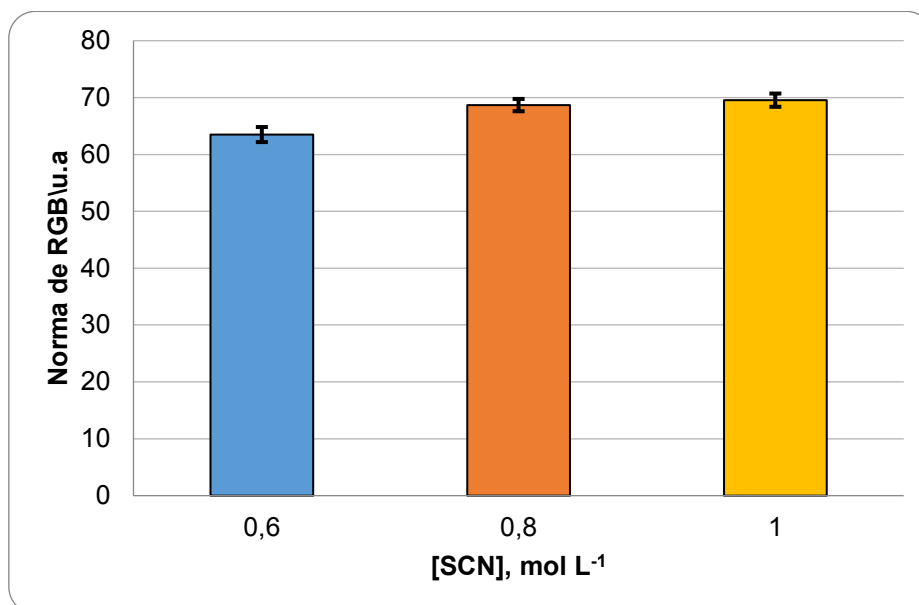
O grupo denominado pH 3 difere entre as médias dos demais tratamentos, enquanto que as médias dos tratamentos denominados de pH 1 e pH 2, não diferem entre si. Deste modo, optou-se por adotar o pH 2 para o preparo da solução extratora em relação aos resultados obtidos para pH 1, por estar em consonância à modalidade do método de preparo de amostras que prioriza o uso de ácidos mais diluídos para a extração ao tempo que mantém a qualidade dos resultados na determinação do analito.

5.3.3 Avaliação da concentração do íon tiocianato

O íon tiocianato forma seis complexos com o Fe^{3+} , sendo um neutro, dois catiônicos e três aniônicos. As soluções que contém estes complexos, seja qual forma iônica for, são caracterizados pela intensa cor vermelha, cuja intensidade da cor está diretamente proporcional a concentração de ferro na amostra. O Fe^{2+} forma um único complexo com o ânion, o FeNCS^+ , altamente instável quando comparado com a mesma proporção complexante 1:1 formado com Fe^{3+} (Filho, 1992).

Para o método proposto, investigou-se a influência da concentração do íon em 0,6; 0,8 e 1 mol L⁻¹ presente na solução extratora de acordo com os sinais analíticos obtidos, apresentados na Figura 16. Teste preliminares descartaram a concentração de 1,2 mol L⁻¹ por obter resultados similares a concentração de 1 mol L⁻¹.

Figura 16.Efeito do estudo da concentração de SCN^- para solução extratora.



Fonte: Autoria própria (2023)

Para verificar a existência de diferença entre as médias, aplicou-se a ANOVA. Os resultados obtidos apresentaram a existência da diferença entre as médias ($p\text{-valor} < 0,05$). Para identificar entre quais tratamentos as médias diferem, aplicou-se o Teste de Tukey para avaliar quais grupos divergem entre si, conforme consta a Tabela 6.

Tabela 6.Teste de Tukey (5% significância) para análise da diferença das médias de $[\text{SCN}^-]$ mol L⁻¹.

$[\text{SCN}^-]$ mol L ⁻¹	Norma RGB (u.a)
0,6	63,49 ± 2,08 a
0,8	68,67 ± 1,58 b
1,0	69,54 ± 1,68 b

Fonte: Autoria própria (2023)

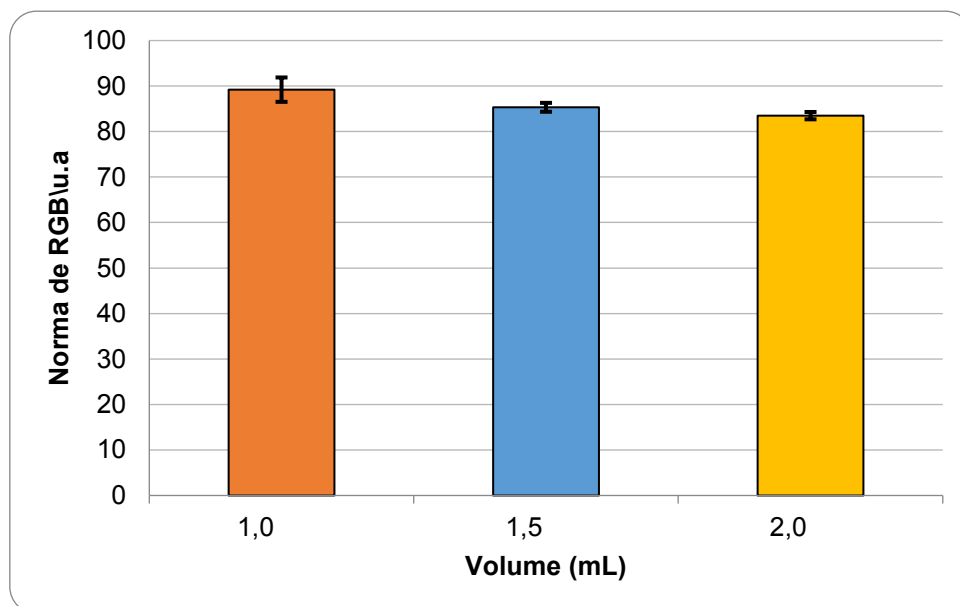
Após a análise do teste de Tukey, optou-se por prosseguir os demais ensaios empregando a concentração de 0,8 mol L⁻¹ para o íon tiocianato, embasando-se na igualdade estatística entre as médias entre as concentrações 0,8 e 1,0 mol L⁻¹ aliado ao menor DPR (1,58% e 1,68%, respectivamente).

5.3.4 Avaliação do volume da solução de solventes dispersor/extrator

Definido o solvente dispersor (isopropanol), o solvente extrator e sua concentração (HNO_3 a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$), a concentração do agente colorimétrico ($0,8 \text{ mol L}^{-1}$) e a proporção entre os solventes dispersor e extrator (70/30 (v/v)), foram testados os volumes da solução dispersora/extratora para injeção na amostra. Os volumes investigados foram 1,0; 1,5 e 2,0 mL, conforme demonstrado na Figura 17.

Convém explicar que o volume 0,5 mL foi de antemão descartado nos testes preliminares, isto porque o processo de dispersão e extração foi afetado diretamente, pois após o processo de centrifugação e separação das fases, restou uma alíquota da fase aquosa inferior a 0,5 mL para leitura no equipamento desenvolvido para aquisição de imagem e, conseqüentemente, inviabilizou a captura da imagem.

Figura 17. Efeito do estudo do volume da solução dos solventes dispersor/extrator.



Fonte: Autoria própria (2023)

Diante dos resultados obtidos para os três tratamentos, aplicou-se o teste da ANOVA e concluiu-se não haver diferença estatística entre as médias dos volumes, no intervalo de significância de 5% ($p\text{-valor} > 0,05$). Sendo assim, a escolha do tratamento embasou-se na transparência e credibilidade do método proposto, tendo em vista que o sinal analítico obtido para o volume 1,0 mL,

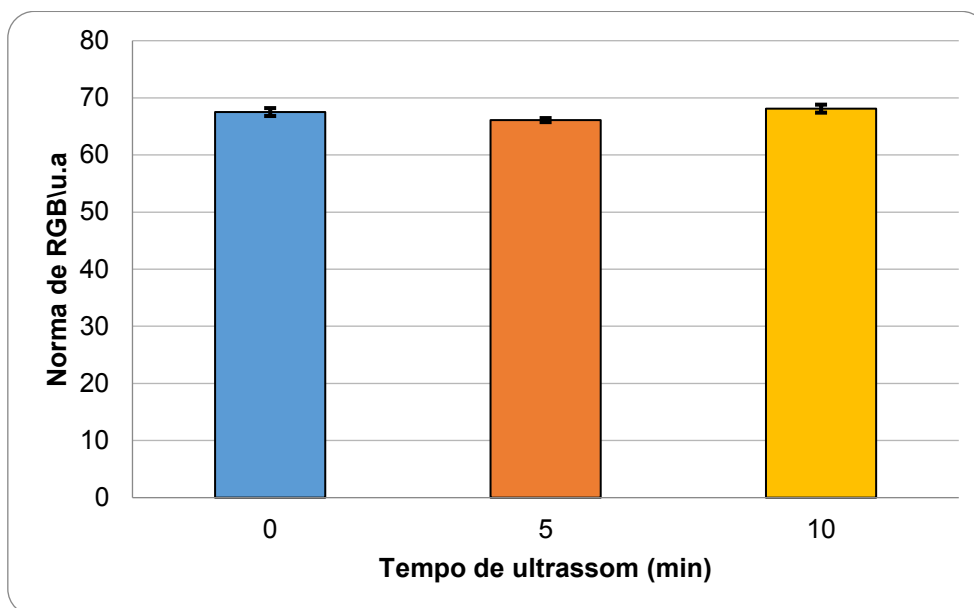
apesar de maior, não apresentou diferença significativa em relação aos demais tratamentos e, deste modo foi descartado para uso, porque o pequeno volume da fase aquosa, após a centrifugação, pode ter interferido na etapa de aquisição de imagem. Portanto, por não haver diferença estatística entre os tratamentos ao nível de 95% de confiança, optou-se por selecionar o volume 1,5 mL como o mais adequado para o método. Coincidentemente, este volume também apresentou os menores valores para desvio padrão em relação aos demais.

5.3.5 Avaliação do uso da radiação de ultrassom

O ultrassom é comumente utilizado para auxiliar extrações de metais em amostras oleosas nos métodos que empregam a RP-DLLME e, em alguns casos, beneficia o processo de extração (Takashima *et al.*, 2016; Silva, 2017). A microextração assistida por ultrassom promove o fenômeno de cavitação, que forma e colapsa bolhas na amostra, facilitando o processo de extração do analito de interesse. Isto é, o ultrassom é utilizado como aliado na função de promover o aumento da área superficial das microgotas do solvente extrator nas amostras (Bendicho *et al.*, 2012; Silva, 2017).

O uso de ultrassom para auxiliar o método de RP-DLLME foi reportado em pesquisas para extração de metais em matrizes oleosas distintas e em alguns casos, mostrou-se aliada ao processo de microextração, ainda mais quando aliado ao aquecimento simultâneo da amostra oleosa, promovendo a diminuição da viscosidade das amostras oleosas e favorecendo a interação entre as fases aquosa e orgânica. (López-García; Vicente-Martínez; Hernández-Córdoba, 2014; Lopez-Garcia *et al.*, 2015; Silva, 2017)

Para o método de RP-DLLME desenvolvido nesta pesquisa, avaliou-se o uso de ultrassom em 0, 5 e 10 minutos e fixou-se os demais parâmetros do equipamento (37 kHz, potência 70 W e 25°C). Na Figura 18 os resultados foram apresentados.

Figura 18. Efeito do estudo do uso de ultrassom.

Fonte: Autoria própria (2023)

Ao analisar preliminarmente as médias obtidas, verificou-se não aparentar diferença entre as médias. Para confirmar isto, aplicou-se o teste da ANOVA e conclui-se não haver diferença estatística entre as médias dos tempos de duração de exposição ao ultrassom, no intervalo de significância de 5% ($p\text{-valor} > 0,05$). A princípio, o banho de ultrassom de duração de 10 minutos obteve o maior sinal analítico, no entanto, por não haver diferença estatística entre a média, optou-se por não utilizar a radiação de ultrassom nos testes dos demais parâmetros para tornar mais breve o processo de preparo de amostras.

Desta forma, o equipamento de ultrassom foi utilizado somente na função banho maria, fixando-se o tempo de banho como 15 minutos para promover a diminuição da viscosidade da amostra.

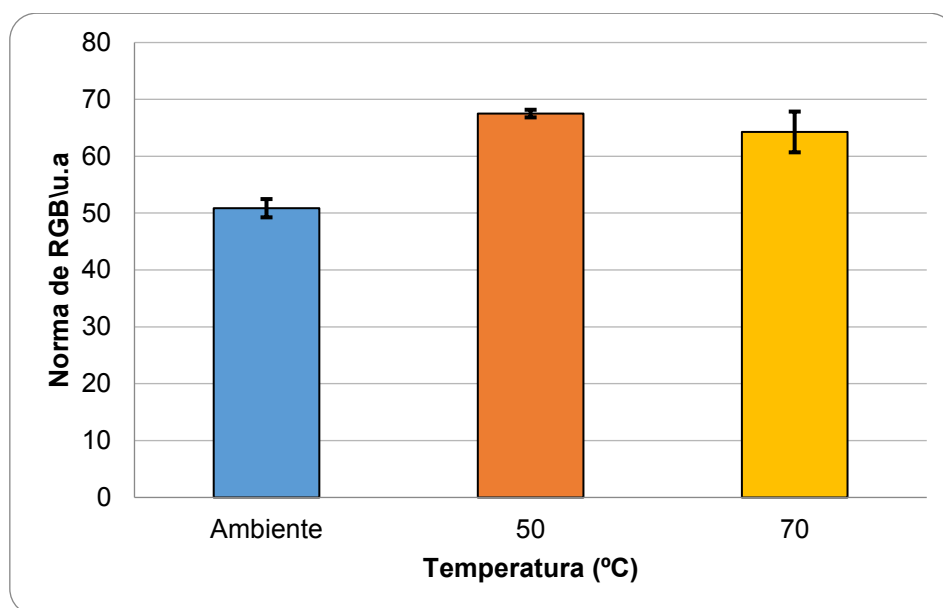
5.3.6 Avaliação da temperatura

Para amostras oleosas cujo preparo de amostras é o método RP-DLLME, um dos parâmetros recorrentemente investigado do método é a temperatura. O aquecimento da amostra se faz necessário para que a viscosidade do meio reacional seja reduzida facilitando o processo de formação de microgotas, tão essencial para o processo de dispersão e extração. (Kalschne *et al.* 2020).

Para a matriz de biodiesel, Lourenço e colaboradores (2019) investigaram as temperaturas de 45, 55, 65 e 75 °C, optando por esta última temperatura para aplicação ao método proposto. Takashima e colaboradores (2016) analisaram a influência da temperatura por meio de um grupo de controle (sem aquecimento) e o aquecimento de 50°C. Silva (2017) fixou a temperatura de 80°C para o método proposto de RP-DLLME. Nestes trabalhos, ambos autores ressaltaram a importância de atentar-se quanto ao ponto de ebulição do solvente dispersor, para que não ocorra perda deste solvente e prejudique o desempenho da interação entre as fases.

Para o método proposto, as temperaturas testadas foram de temperatura ambiente (25 °C), 50 °C e 70 °C. Os valores para o sinal analítico estão representados na Figura 19.

Figura 19. Efeito do estudo do controle de temperatura.



Fonte: Autoria própria (2023)

De posse dos resultados obtidos, aplicou-se o teste da ANOVA e concluiu-se haver diferença estatística entre as médias dos tempos de duração de exposição ao banho, no intervalo de significância de 5% (p -valor < 0,05). Por haver diferença significativa, aplicou-se o Teste de Tukey de igual nível de significância (5%). A diferença entre as médias está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Teste de Tukey (5% significância) para análise da diferença das médias de temperatura.

Temperatura	Norma RGB (u.a)
Ambiente	50,86 ± 3,16 a
50°C	67,50 ± 1 b
70 °C	64,27 ± 5,58 b

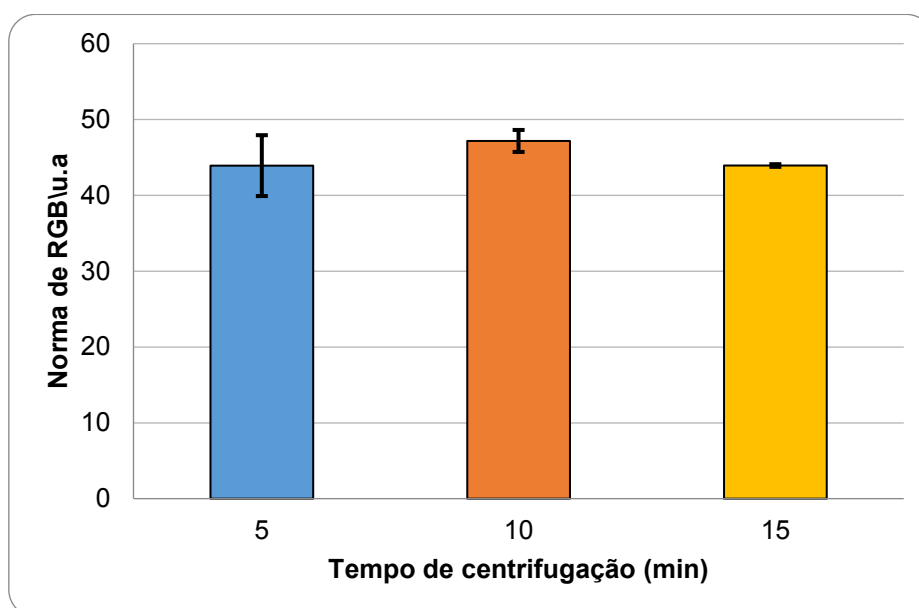
Fonte: Aatoria própria (2023)

Constatada a diferença entre as médias, descartou-se a temperatura ambiente como temperatura do método e optou-se por prosseguir os testes utilizando a temperatura de 50°C, por apresentar menor DPR em relação a temperatura de 70°C e por levar menor tempo para atingi-la no banho.

5.3.7 Avaliação do tempo de centrifugação

O momento compreendido entre a injeção da solução dispersora/extratora e o final da centrifugação é definido como tempo de extração. A extração é mais eficaz quando há centrifugação no processo, pois proporciona a separação por densidade entre as fases orgânica e aquosa permitindo que os analitos sejam “arrastados” para a fase aquosa.

Ao avaliar o tempo de centrifugação, considerou-se priorizar tão somente a separação de fases sem estender a investigação para períodos exagerados de duração. Ademais, observou-se a formação de emulsões do tipo óleo em água estáveis na porção aquosa quando empregado o tempo de 15 minutos de duração, o que pode ter interferido diretamente no sinal analítico obtido pela aquisição de imagem. Os resultados do sinal analítico para os tempos de centrifugação 5; 10 e 15 minutos estão apresentados na Figura 20.

Figura 20. Efeito do estudo do tempo de centrifugação.

Fonte: Autoria própria (2023)

Aplicou-se o teste da ANOVA e concluiu-se não haver diferença estatística entre as médias dos tempos de duração de centrifugação para o intervalo de significância de 5% ($p\text{-valor} > 0,05$). Apesar de não haver diferença estatística entre os tratamentos de 5 e 10 minutos, optou-se por selecionar o tempo de 10 minutos para os posteriores ensaios, em detrimento do tempo de 5 minutos, por ter apresentado o maior sinal analítico, aliado ao menor DPR e garantir que, embora em baixa rotatividade da centrífuga (3000 rpm), toda a fase aquosa adicionada a amostra fosse separada da fase orgânica.

5.4 Condições otimizadas dos parâmetros da RP-DLLME para extração de Fe em biodiesel

As condições ótimas provenientes dos estudos dos parâmetros para a determinação de ferro em biodiesel através do método RP-DLLME estão apresentadas na Tabela 8. Nestas condições definidas, as figuras de mérito foram determinadas e, posteriormente, aplicadas no preparo de amostra para determinação de Fe(III) em biodiesel por aquisição de imagens. A partir destas condições delineadas calculou-se as figuras de mérito da metodologia proposta.

Tabela 8. Condições ótimas para o uso de RP-DLLME como preparo de amostras para determinação de Fe(III) em biodiesel por meio de imagens digitais.

Parâmetros	Condições ótimas
Solvente dispersor	Isopropanol
Solvente extrator	HNO ₃
Proporção (solvente dispersor/ solvente extrator)	70/30 (v/v)
pH da solução extratora	2
Concentração do íon tiocianato (solução extratora)	0,8 mol L ⁻¹
Volume da solução (solvente dispersor/ solvente extrator)	1,5 mL
Tempo de Ultrassom (37 kHz, 70 W, temperatura a 35°C)	0 min
Temperatura	50 °C
Tempo de Centrifugação (3000 rpm, 40 s de aceleração e 60 s de frenagem, 25 °C)	10 min

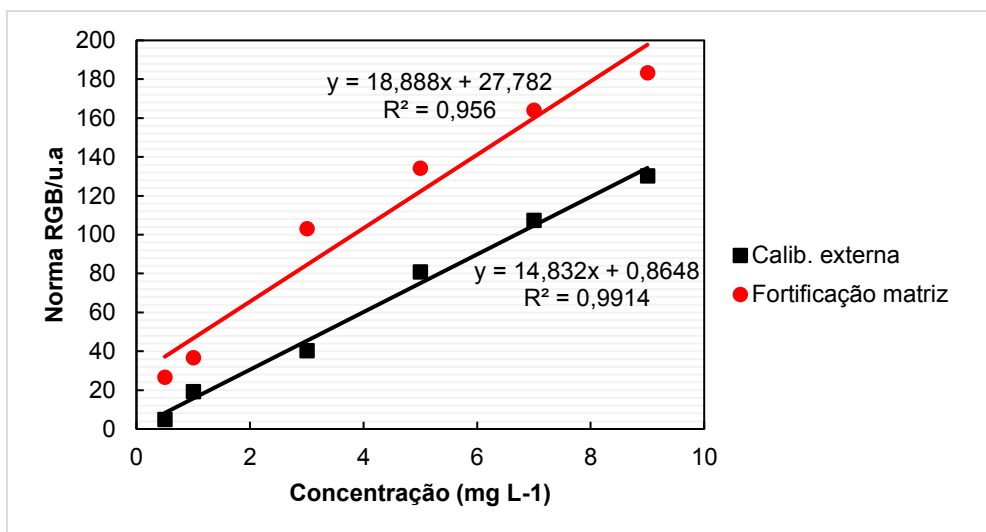
Fonte: Autoria própria (2023)

5.5 Avaliação da linearidade de resposta do complexo de ferro/ tiocianato por imagem digital, em diferentes condições reacionais

Neste estudo, foi avaliada a linearidade de resposta do complexo de ferro/ tiocianato por imagem digital, obtidas no intervalo de concentração de 0,5 a 9,0 mg L⁻¹. Na Figura 21 são apresentados os perfis obtidos da determinação do complexo por imagem, empregando: a) fortificação da matriz biodiesel com padrões organometálicos e b) calibração externa, formação do complexo na solução dispersora/extratora (isopropanol/SCN⁻ 0,8 mol L⁻¹ em sol. de HNO₃, pH 2) na proporção de 70/30% (v/v).

. Em ambos os procedimentos foi observado correlação linear acima de 95%, no intervalo analisado.

Figura 21. Perfil da linearidade de resposta do complexo Fe/tiocianato em diferentes meios reacionais.



Fonte: Autoria própria (2023)

As funções que descrevem o comportamento linear das retas são apresentadas na Tabela 9.:

Tabela 9. Parâmetros das retas das curvas analíticas.

Calibração externa (sol. dispersora/extratora)		Fortificação da matriz óleo	
R ²	Equação da reta	R ²	Equação da reta
0,9914	$y = 16,167x + 0,8648$	0,9560	$y = 18,888x + 27,782$

Fonte: Autoria própria (2023)

Para ambos os procedimentos de calibração a linearidade foi observada no mesmo intervalo de concentração 0,5 a 9,0 mg/L. Porém, o procedimento de calibração realizada por fortificação da matriz (biodiesel) a sensibilidade observada (coeficiente angular) foi ligeiramente maior (18,89 > 16,17), quando comparado com a curva obtida por calibração externa em solução dispersora/extratora. O valor do coeficiente linear obtido para o procedimento de fortificação foi consideravelmente maior que zero (0), mesmo descontando os valores do branco (isopropanol/ HNO₃, 0,01 mol L⁻¹ na proporção de 70/30% (v/v)). Esse resultado indica que no procedimento de extração do ferro da matriz biodiesel há possibilidade de algum outro composto estar sendo extraído para a

fase aquosa em decorrência da interação do complexo Fe/tiocianato formado, indicando um possível efeito de matriz biodiesel na análise.

Para verificar a possibilidade do emprego da determinação de ferro em biodiesel empregando o procedimento de calibração externa (procedimento de calibração mais trivial em rotinas de análises) um estudo de adição e recuperação em dois níveis de concentração (4 e 8 $\mu\text{g g}^{-1}$ de biodiesel) foi realizado e os resultados obtidos empregando os dois procedimentos de calibração são apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Comparação entre o desempenho dos testes de recuperação nas curvas analíticas.

% de Recuperação		
Fe (III)	Calibração externa	Fortificação da matriz (biodiesel)
4 $\mu\text{g g}^{-1}$	158 \pm 0,06	91 \pm 2,30
8 $\mu\text{g g}^{-1}$	123 \pm 0,34	90 \pm 7,20

Fonte: Autoria própria (2023)

Os valores de recuperação observados para o protocolo de calibração externa variam entre 123 a 158%, indicando algum efeito interferente na matriz que superestima a concentração de ferro no biodiesel. Já os valores de recuperação observados quando realizada a fortificação da matriz (biodiesel) apresentaram valores recuperação em torno de 90%, um limite valor de recuperação aceitável, dentro do contexto de análise de metal numa matriz oleosa complexa.

Em decorrência da heterogeneidade das amostras de biodiesel, (cor, densidade, mistura e proporção de óleos no processo de transesterificação, etc) optou-se por empregar o procedimento de adição de padrão (*i.e* fortificação da amostra) nos procedimentos de determinação de ferro em biodiesel.

5.6 Figuras de mérito do método proposto RP-DLLME/Imagens digitais

Para o cálculo das figuras de mérito do método proposto, foi seguida as recomendações do documento orientativo DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre

validação de métodos analíticos, do INMETRO (2020), para os parâmetros de linearidade, sensibilidade, LD, LQ, exatidão e precisão.

Para o parâmetro de linearidade e sensibilidade foi realizada curva de calibração pelo método adição-padrão, com o padrão orgânico de Fe (Specsol, Brasil), conforme apresentado na Tabela 11:

Tabela 11. Parâmetros de linearidade para ferro (III).

Analito	R²	Equação da reta	Faixa linear mg L⁻¹
Fe	0,96	$y = 18,888x + 27,782$	0,5 - 9

Fonte: Autoria própria (2023)

Observou-se o comportamento linear para o Fe (III), devido à alta correlação entre as concentrações e o respectivo sinal analítico. Esta correlação evidencia que a equação da reta pode ser utilizada como modelo matemático neste estudo para os cálculos das demais figuras de mérito.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da leitura do branco analítico (n=10), conforme citados na Seção 4.8, e estão apresentados na Tabela 12 abaixo. O branco analítico foi submetido a todas as etapas do método proposto e otimizado de RP-DLLME, menos a adição do padrão orgânico de ferro.

Tabela 12. LD e LQ do método proposto.

Analito	LD mg L⁻¹	LQ mg L⁻¹
Fe	0,15	0,5

Fonte: Autoria própria (2023)

A exatidão do método foi realizada a partir de ensaios de recuperação de ferro que foram realizados de acordo com a Seção 4.8. Os testes foram feitos em duas amostras de biodiesel sem aditivos e duas amostras de biodiesel com aditivos, em dois níveis de concentração de padrão de ferro 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de biodiesel e 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ de biodiesel, respectivamente. Os ensaios foram conduzidos de acordo com as condições otimizadas da Tabela 8, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Recuperação de Fe em 2 níveis de concentração (n=3).

Amostra	Recuperação (%)	
	0,5 µg Fe/g biodiesel	3,0 µg Fe/g biodiesel
Biodiesel s/aditivo		
A	91,8 ±1,5	93,3 ±1,8
B	90,3 ±1,9	96,5 ±1,5
Biodiesel c/aditivo		
D	78,3 ±1,2	69,1 ±2,3
E	76,3 ±1,6	70,3 ±1,4

Fonte: Autoria própria (2023)

De acordo ao documento orientativo DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos, emitido pelo Inmetro, o critério de aceitação para os resultados obtidos na recuperação de analitos entre as faixas de concentração investigadas devem estar entre os valores de 80-110%. O mesmo documento delibera sobre o critério de aceitação de repetibilidade para métodos nas concentrações investigadas através do desvio padrão relativo. Para estas concentrações, o documento exige DPR de 7,3 - 11 %. O método proposto obteve resultados para recuperação e precisão dentro da faixa delimitada para as duas concentrações das amostras de biodiesel **sem** aditivo, sendo, portanto, uma metodologia aceita para determinação de ferro (III) em biodiesel sem aditivo por imagens digitais.

Entretanto, para as amostras de biodiesel **com** aditivo, os valores de recuperação obtidos estão abaixo do aceito pela norma. Presume-se que o aditivo tenha impedido que a RP-DLLME ocorresse de forma efetiva na amostra, implicando em baixos valores para recuperação do método.

5.7 Determinação de ferro em amostras comerciais de biodiesel

Os resultados obtidos nas análises de 5 amostras de biodiesel, 3 amostras sem aditivo e 2 com aditivos, foram comparados com o procedimento de determinação de ferro em frasco único com detecção por imagem, proposto neste trabalho, e estão apresentados na Tabela 14.

Como técnica comparativa foi empregada a técnica de formação de emulsão para a extração e pré-concentração de metais em diversas matrizes

oleosas, como biodiesel (Souza *et al.*; 2008), óleo vegetal (Cerqueira *et al.* 2022) e óleo mineral isolante (Cassella *et. al.*, 2018), com detecção por técnicas espectrométricas de emissão ou absorção atômica.

Para a determinação de ferro em amostras de biodiesel empregando o protocolo proposto RP-DLLME/Imagem digital, foi empregado o procedimento de adição de padrão, uma vez que as amostras de biodiesel contendo aditivo apresentaram recuperações inferiores a 80%.

Tabela 14. Determinação da concentração de ferro em amostras de biodiesel empregando o RP-DLLME com detecção por imagem digital e por EIQE com detecção por FAAS (n = 3).

Amostras de biodiesel	RP-DLLME/Imag. Digital Conc. Ferro (mg Kg ⁻¹)	EIQE/FAAS Conc. Ferro (mg Kg ⁻¹)
A - Sem aditivo	1,47 ± 0,15	1,43 ± 0,12
B - Sem aditivo	1,77 ± 0,09	1,69 ± 0,08
C - Sem aditivo	1,29 ± 0,15	1,16 ± 0,13
D - Com aditivo	2,87 ± 0,18	2,70 ± 0,15
E - Com aditivo	2,53 ± 0,17	2,69 ± 0,10

Fonte: Autoria própria (2023)

As concentrações de ferro determinadas nas amostras de biodiesel sem aditivo (A-C) variaram entre 1,16 a 1,69 mg Kg⁻¹ quando estimadas com a técnica de EIQE/FAAS e entre 1,29 a 1,77 mg Kg⁻¹ para o procedimento proposto (RP DLLME/Imagem Digital). A análise estatística da comparação entre os tratamentos nos grupos evidenciou não haver diferença significativa entre as médias, ao nível de 5% de significância. Quando comparado os dois tratamentos para cada amostra de biodiesel sem aditivo de modo individual constatou-se haver diferença entre as médias somente para amostra denominada de C –Sem aditivo, ao nível de 5% de significância, em que o método proposto se mostrou mais eficaz para determinação de ferro em biodiesel.

As concentrações de ferro determinadas nas amostras de biodiesel contendo aditivos (C e D), as concentrações variaram entre 2,69 a 2,70 mg Kg⁻¹ por EIQE/FAAS e entre 2,53 a 2,87 mg Kg⁻¹ por (RP DLLME/Imagem Digital), respectivamente. O tratamento estatístico ao nível de 5% de significância evidenciou não haver diferença estatísticas entre as médias dos grupos. Para a análise estatística individual de cada amostra de biodiesel com aditivo, a comparação entre as médias não demonstrou diferença ao mesmo nível.

Tanto o método de EIQE/FAAS quanto o método RP-DLLME/Imagem digital mostraram-se adequados para a determinação de ferro em biodiesel. No entanto, ao examinar as particularidades de cada método, o RP-DLLME em frasco único se destaca pelo uso do ácido mais diluídos, menos etapas de preparo, temperaturas não tão elevadas quando comparado ao método EIQE/FAAS, procedimento mais breve por não ter a etapa da quebra de emulsão e a possibilidade de analisar a fase aquosa sem a necessidade de extraí-la e prepará-la para se tornar compatível ao equipamento de leitura.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos do método proposto demonstraram a possibilidade do uso da RP-DLLME em frasco único para determinação de ferro em biodiesel por aquisição de imagens digitais. A otimização do método oportunizou o emprego de ácido diluído e em baixíssimo volume para a microextração. Outra vantagem identificada no método foi a proposta do uso do conceito de análise em frasco único, que só foi possível por ser um conceito compatível com a técnica analítica de aquisição de imagens digitais.

Por conta disso, o método RP-DLLME/Imagem Digital apresentou inúmeros benefícios em detrimento dos métodos tradicionais, dentre eles: baixo custo para montagem do equipamento para leitura, menos tempo despendido na análise devido ao uso do conceito de frasco único, redução das etapas analíticas devido ao método e técnica escolhidos e simplicidade do método ao utilizar conceitos básicos como agentes colorimétricos e complexação para correlacionar a concentração de ferro em amostras de biodiesel.

A respeito das figuras de mérito do método proposto, os resultados obtidos dos parâmetros de linearidade ($R=0,96$), sensibilidade, LD ($0,150 \text{ mg L}^{-1}$), LQ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), exatidão e precisão (90-96%) estão todos de acordo com as exigências do Inmetro e os documentos norteadores para a validação de métodos analíticos. No que concerne a análise de amostras de biodiesel com aditivo, novos estudos deverão ser realizados para verificar a influência dos aditivos no método proposto.

Em resumo, o método de preparo de amostras por RP-DLLME e determinação por imagem digital em frasco único é uma metodologia promissora para estudo preliminares visando identificar a presença de ferro em amostras de biodiesel por colorimetria. É promissora, do mesmo modo, pelo fato de ser simples e acessível, visto que uma grande parte da população dispõe de câmeras digitais na palma da mão, através de *smartphones*, uma ferramenta tão usual no cotidiano que pode servir também como técnica analítica de determinação de metais em biodiesel, por exemplo. Outrossim, o método proposto está em consonância aos princípios da química analítica verde.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Resolução ANP nº. 7 de 19 de março de 2008.** – DOU 20 de março de 2008. 2008. Disponível em: <https://atosoficiais.com.br/anp/resolucao-n-7-2008-> Acesso em: 11 de abril de 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Resolução ANP nº. 45 de 25 de agosto de 2014.** – DOU 26 de agosto de 2014. Disponível em: [https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=274064.](https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=274064) Acesso em: 11 de abril de 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Relatório de consolidação dos testes e ensaios para validação da utilização de Biodiesel B15 em motores e veículos.** 20190 Disponível em: [https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/secretarias/petroleo-gas-natural-e-biocombustiveis/biodiesel/documentos/relatorios-de-aprovacao-do-b15.](https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/secretarias/petroleo-gas-natural-e-biocombustiveis/biodiesel/documentos/relatorios-de-aprovacao-do-b15) Acesso em: 11 de abril de 2022.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301-312, 2010. DOI: 10.1039/B918763B. Disponível em: [https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/cs/b918763b.](https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/cs/b918763b) Acesso em: 20 de maio de 2023.

ANDRIOLLI, C. R. **Desenvolvimento de método utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para a determinação de As, Cd, Hg, Pb, Co, Ni e V em excipientes farmacêuticos oleosos.** 2021. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Química, Santa Maria, 2021. Disponível em: [https://repositorio.ufsm.br/handle/1/23097.](https://repositorio.ufsm.br/handle/1/23097) Acesso em 20 de maio de 2023.

ANTUNES, G. A.; DOS SANTOS, H. S.; SILVA, Y. P.; SILVA, M. M.; PIATNICKI, C. M. S.; SAMIOS, D. Determination of iron, copper, zinc, aluminum, and chromium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry using a microemulsion preparation method. **Energy fuel**, v. 31, p. 2944-2950. 2017. DOI: [https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b03360.](https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b03360) Disponível em: [https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.energyfuels.6b03360.](https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.energyfuels.6b03360) Acesso em: 21 de junho de 2023.

ARANDA, D. A. G. ; TAPANES, N. de La C. O. ; GONÇALVES, J. A.; ENCARNAÇÃO, A. P. G. ; CARNEIRO, J. W. de M. . Technical and Financial Aspects of Biodiesel Production using Heterogeneous Catalysis. *In*: 8th World Congress in Chemical Engineering, 2009, Montreal. **Anais do 8th World Congress in Chemical Engineering**, 2009. Disponível em: [https://www.certh.gr/167A24DE.en.aspx.](https://www.certh.gr/167A24DE.en.aspx) Acesso em: 21 de junho de 2023.

ARAÚJO, M. C. U. de. BRUNS, R. E. O método generalizado das adições-padrão e a eliminação de interferências em análise multicomponente. **Química**

Nova. N. 14, v. 2, p. 104-108. 1991. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170936> . Disponível em: https://quimicanova.s bq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=2147. Acesso em 21 de junho de 2023.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15553**: Produtos derivados de óleo e gorduras – Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos- Determinação do teor de Sódio, Fósforo, Magnésio, Potássio e Cálcio por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Rio de Janeiro, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15556**: Produtos Derivados de Óleos e Gorduras – Ésteres Metílicos/Étilícos de Ácidos Graxos - Determinação do Teor de Sódio, Potássio, Magnésio e Cálcio por Espectrometria de Absorção Atômica. Rio de Janeiro, 2008.

BENDICHO, C., DE LA CALLE, I., PENA, F., COSTAS, M., CABALEIRO, N., & LAVILLA, I.. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 31, 50–60, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.018>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993611002834>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

BENEDETTI, L. P. dos S. ; DOS SANTOS, V. B. ; SILVA, T. A. ; FILHO, E. B. ; MARTINS, V. L. ; FATIBELLO-FILHO, O. . A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. *Analytical Methods*, v. 7, p. 4138-4144, 2015. DOI: **DOI: <https://doi.org/10.1039/C5AY00529A>**. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/ay/c5ay00529a>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

BÖCK, F. C., HELFER, G. A., da COSTA, A. B., DESSUY, M. B., FERRÃO, M. F. Low cost method for copper determination in sugarcane spirits using Photometrix UVC® embedded in smartphone. *Food Chemistry*, 367, 130669. 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130669>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621016757>. Acesso em 05 de agosto de 2023.

BÖCK, F. C., HELFER, G. A., da COSTA, A. B., DESSUY, M. B., FERRÃO, M. Photometrix and Colorimetric Image Analysis Using Smartphones. *Journal of Chemometrics*. v. 34, Issue 12. DOI: <https://doi.org/10.1002/cem.3251>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cem.3251>. Acesso em: 01 de agosto de 2023.

BRASIL. **Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005**. Brasília: Diário Oficial da União. Disponível em: <https://legis.senado.leg.br/norma/570546#:~:text=Disp%C3%B5e%20sobre%20>

a%20introdu%C3%A7%C3%A3o%20do,2002%3B%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%AAs. Acesso em: 11 de abril de 2022.

BRASIL. **Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016.** Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Diário Oficial da União, Brasília. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2016/lei/l13263.htm. Acesso em: 11 de abril de 2022.

BRASIL. **Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014.** Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, e 8.723, de 28 de outubro de 1993; revoga dispositivos da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005; e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2014/Lei/L13033.htm. Acesso em: 11 de abril de 2022.

CALDAS, L. F. S.; PAULA, C. E. R. de; BRUM, D. M.; CASSELLA, R. J. Application of a four-variables Doehlert design for the multivariate optimization of copper determination in petroleum-derived insulating oils by GFAAS employing the dilute-and-shot approach. **Fuel**. V. 105, p. 503-511, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.10.026>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001623611200823X>. Acesso em 25 de maio de 2023.

CALDAS, L. F. S.; de PAULA, C. E. R.; BRUM, D. M.; LEPRI, F. G.; CASSELLA, R. J. Avaliação de diferentes métodos para a determinação de cobre em óleo mineral isolante por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. **Quim. Nova**, 37, 776, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140125>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/QmmPFZKcpBQ9SFpcVcQpcMp/?lang=pt>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

CASSELLA, R. J.; BRUM, D. M.; de PAULA, C. E. R.; LIMA, C. F. Extraction induced by emulsion breaking: A novel strategy for the trace metals determination in diesel oil samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom**, 25, 1704, 2010. DOI: **DOI: <https://doi.org/10.1039/C0JA00035C>**. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/ja/c0ja00035c>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

CASSELLA, R. J.; BRUM, D. M.; ROBAINA, N. F.; LIMA, C. F. Extraction induced by emulsion breaking: A model study on metal extraction from mineral oil. **Fuel**, 215, 592, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.11.102>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236117315041>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

CASSELLA, R. J.; BRUM, D. M.; ROBAINA, N. F.; ROCHA, A. A.; LIMA, C. F. Extraction induced by emulsion breaking for metals determination in diesel oil

by ICP-MS. **J. Anal. At. Spectrom**, 27, 364, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1039/C2JA10279J>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/ja/c2ja10279j>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

CERQUEIRA, U.M.F., VALASQUES, G.S., SOUZA, C.T. et al. Extraction Induced by Emulsion Breaking for Ca, Fe, Mg, and Zn Determination in Edible Oils Using High-Resolution Continuous Source Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Food Anal. Methods** v.15, p. 1098–1106, 2022. em: 08 jan. 2022. DOI:10.1007/s12161-021-02216-9. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/357647508_Extraction_Induced_by_Emulsion_Breaking_for_Ca_Fe_Mg_and_Zn_Determination_in_Edible_Oils_Using_High-Resolution_Continuous_Source_Flame_Atomic_Absorption_Spectrometry. Acesso em: 21 de junho de 2023.

CHAVES, E. D. LEPRI, F. G. SILVA, J. S. A.; QUADROS, D. P. C. de; SAINT'PIERRE; T. D.; CURTIUS, A. J. Determination of Co, Cu, Fe, Mn, Ni and V in diesel and biodiesel samples by ETV-ICP-MS. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 10, n. 10, p.1211, 2008. Doi: 10.1039/b809501a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19244645/>. Acesso em: 21 de julho de 2023.

CHAVES, E. S., DE LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C., CURTIUS, A. J., VANHAECKE, F.. Determination of trace elements in biodiesel and vegetable oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry following alcohol dilution. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66(9-10), p. 733–739, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sab.2011.09.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0584854711001935>. Acesso em: 22 de julho de 2023.

CNPE. **Resolução CNPE nº 16, de 29 de outubro de 2018**. Dispõe sobre a evolução da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. Conselho Nacional de Política Energética. Brasília: Diário Oficial da União. Fonte: www.mme.gov.br/documents/10584/71068545/Resolucao_16_CNPE_29-10-18.pdf. Acesso em: 11 de abril de 2022.

COSTA, R. A.; VITTORAZZI, B. V.; BARBOSA, A. P.; ROCHA, V. B.; BRANDÃO, J. M. O. B.; LACERDA JR, V.; FILGUEIRAS, P. R.; ROMÃO, W. Use of a Portable Microscope Combined with a Smartphone to Determine the Authenticity of Brazilian Banknotes and National Driver's Licenses. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 33, n. 5, p. 437-445, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210162>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/MfYgSZp5qPbjbflVtFWfN5L/abstract/?lang=en>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

DOS SANTOS, G. F.S.; FERREIRA, R. Q. Determination of Pb(II) and Cu(II) in microemulsified biodiesel using boron-doped Diamond electrode. **Microchemical Journal**, v.156, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104849>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X19334484>. Acesso em: 22 de julho de 2023.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Análise de conjuntura dos biocombustíveis – Ano 2021**. Nota Técnica EPE/DPG/SDB/2021/03. 2022. Disponível em <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/analise-de-conjuntura-dos-biocombustiveis>>. Acesso em: 10 de julho de 2023.

FAZAL, M. A.; SUHAILA, R.; HASEEB, A. S. M. A.; RUBAIEE, S.; AL-ZAHRANI. Influence of copper on the instability and corrosiveness of palm biodiesel and its blends: An assessment on biodiesel sustainability. **Journal of Cleaner Production**. V. 5, p 33-39, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.144>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959652617324502>. Acesso em: 22 de julho de 2023.

FERREIRA, V. J., ALMEIDA, J. S.; LEMOS, V. A.; OLIVEIRA, O. M. C.; GARCIA, K. S.; TEIXEIRA, L. S. G. Determination of Cu, Ni, Mn, and Pb in diesel oil samples using reversed-phase vortex-assisted liquid-liquid microextraction associated with energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry. **Talanta**, v. 222, 121514, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121514>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914020308055>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

FILHO, O. B. . O Uso de Soluções de Ferro(III)-Tiocianato Para Lixiviação de Ouro. Parte1: Processos Redox Em Soluções de Ferro(III)-Tiocianato. *In*: V. S. T Ciminelli; M. J. G. Salum. (Org.). *Extração de Ouro Fundamentos, Prática e Meio Ambiente*. 1ed. Belo Horizonte: Ass. Bras. Tec. Min., 1992, v. , p. 52-71. Disponível em: https://www.artigos.entmme.org/download/1992/gold_extraction-extra%C3%A7%C3%A3o_de_ouro/787%20-%20O.%20Barbosa%20Filho%20-%20O%20USO%20DE%20SOLU%C3%87%C3%95ES%20DE%20Fe-TIOCIANATO%20PARA%20LIXIVIA%C3%87%C3%83O%20DE%20OURO%20PARTE%202%20Estudo%20com%20Disco%20Rotativo%20de%20Ouro.pdf. Acesso em: 22 de junho de 2023.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **TrACTrends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>. Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993613001234>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p.

HASHEMI, P.; RAESI, F.; GHIASVAND, A. R.; RAHIMI, A. Reverse-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein. **Talanta**, v. 80, p. 1926-1931, 2010. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.10.051. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20152434/>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

HE, Y. M.; ZHAO, F. F.; ZHOU, Y.; AHMAD, F.; LING, Z. X. Extraction induced by emulsion breaking as a tool for simultaneous multi-element determination in used lubricating oils by ICP-MS. **Anal. Methods**, v. 7, p. 4493, 2015. DOI: DOI <https://doi.org/10.1039/C4AY03024A>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/ay/c4ay03024a>. Acesso em: 22 de julho de 2023.

HELPER, G. A.; MAGNUS, V. S.; BÖCK, F. C.; TEICHMANN, A.; FERRÃO, M. F.; COSTA, A. B. PhotoMetrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis Using Colorimetry on Mobile Devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 328. 2017. DOI: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160182>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/ffHbpmCZ3LBtrkBRjwQwfcs/abstract/?lang=en>. Acesso em 22 de junho de 2023.

HOLKEM, A. P., VOSS, M., SCHLESNER, S. K., HELPER, G. A., COSTA, A. B., BARIN, J. S., MELLO, P. A. A green and high throughput method for salt determination in crude oil using digital image-based colorimetry in a portable device. **Fuel**, v. 289, 119941. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119941>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236120329379>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. INMETRO, v. 9, Rio de Janeiro, jun., 2020. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf>. Acesso em: 28 de abril de 2022.

ISSARIYAKUL, T; DALAI, A. K. Biodiesel from vegetable oils. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 446–471. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032113007508>. Acesso em: 21 de maio de 2023.

JESUS, A.; ZMOZINSKI, A.V.; LAROQUE, D. O.; SILVA, M. M. Sequential multi-element determination of trace-metals in biodiesel samples using hr-cs FAAS. **Química Nova**. V. 44, N 2, 205-210, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170678> . Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/t9PnMwHffckmxFVFFbBXdKn/?lang=en>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

JUNIOR, D. S.; NÓBREGA, J. A.; CARVALHO, G. G. A. de; KRUG, F. J. Erros sistemáticos no preparo de amostra in. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. *In Preparo de Amostras para Análise Elementar*, 2ª Edição, São Paulo:EditSBQ, 2019.

KALSCHNE, D. L.; CANAN, C.; BEATO, M. O.; LEITE, O. D.; FLORES, E. L. M. A new and feasible analytical method using reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME) for further determination of Nickel in hydrogenated vegetable fat. **Talanta**, v. 208, p. 120409, fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120409>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914019310422>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.; KRAHL, J., TRAD.; RAMOS, L. P., Manual do Biodiesel, Ed. Blucher, São Paulo, 2006.

KNOTHE, G.; STEIDLEY, K. R. The effect of metals and metal oxides on biodiesel oxidative stability from promotion to inhibition. **Fuel Processing Technology**, , v.177, p. 75-80, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2018.04.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378382018303953>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

KRUG, F. J.. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar / 2. ed. rev. ampl. / editado por Francisco José Krug; Fábio Rodrigo Piovezani Rocha - São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 586 p., 2019**

LEITE, C. C.; JESUS, A.; KOLLING, L.; FERRÃO, M. F.; SAMIOS, D.; SILVA, M. M. Extraction method based on emulsion breaking for the determination of Cu, Fe and Pb in Brazilian automotive gasoline samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochim. Acta - Part B**, 142, 62, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sab.2018.01.018>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0584854717303695>. Acesso em: 22 de julho de 2023.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. "Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova [online]**, , v. 26, n. 1, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100020>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/XQTWJnBbnJWtBCbYsKqRwsy>. Acesso em: 21 de junho de 2023.

LIMA M.B., ANDRADE S.I.E., NETA M.S.S., BARRETO I.S., ALMEIDA L.F., ARAÚJO M.C.U., A micro-flow-batch analyzer using webcam for spectrophotometric determination of orthophosphate and aluminium(III) in tap water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 25, n. 5, p. 898-906, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140059> . Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/7fGDPLvYCvhm6tBxXKZgY7L/abstract/?lang=en> . Acesso em: 21 de junho de 2023.

LOBO, F.A.; GOVEIA, D.; OLIVEIRA, A. P.; ROMÃO, L. P. C.; FRACETO, L. F.; FILHO, N. L. D.; ROSA, A. H. Development of a method to determine Ni e Cd in biodiesel by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Fuel**, v. 90, p.142-146, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.09.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016236110004801>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

LÓPEZ-GARCÍA, I.; VICENTE-MARTÍNEZ, Y.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of cadmium and lead in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry after reverse dispersive liquid-liquid microextraction. **Talanta**, v. 124, p. 106–110, jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914014000897>. Acesso em: 24 de junho de 2023.

LÓPEZ-GARCÍA, I.; BRICEÑO, M.; VICENTE-MARTÍNEZ, Y.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Rapid screening of water soluble arsenic species in edible oils using dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, n.167, p. 396-401, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.121>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814614010206>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

LOURENÇO, E. C.; EYNG, E.; BITTENCOURT, P. R.S. ; DUARTE, F. A. ; PICOLOTO, R. S. ; FLORES, É. L.M. . A simple, rapid and low cost reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of Na, K, Ca and Mg in biodiesel. **Talanta** , v. 199, p. 1-7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.054>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914019301912>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

LYRA, F. H.; CARNEIRO, M. T. W. D.; BRANDÃO, G. P.; PESSOA, H. M.; DE CASTRO, E. V. Determination of Na, K, Ca and Mg in biodiesel samples by flame atomic absorption spectrometry (F AAS) using microemulsion as sample preparation, **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 180-185, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.03.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X1000069X>. Acesso em: 22 de julho de 2023.

LYRA, W.S. **Espectrometria de emissão em chama baseada em imagens digitais**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008. Disponível em: https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/7116?locale=pt_BR. Acesso em: 22 de junho de 2023.

LYRA, W. S. , DOS SANTOS, V., DIONIZIO, A., MARTINS, V., ALMEIDA, L., NOBREGA, E., ... ARAUJO, M. Digital image-based flame emission spectrometry. **Talanta**, v. 77 i. 5, p. 1584–1589, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.057>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003991400800711X>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 35-51. 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.004>. Disponível em: <https://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2012.004>. Acesso em: 22 de julho de 2023.

MOHAMMADI, S. Z.; BAGHELANI, Y. M.; MANSORI, F.; SHAMSPUR, T. AFZALI, D. Dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous separation of trace amounts of zinc and cadmium ions in water samples prior to flame atomic absorption spectrometry determination. **Química Nova [online]**, v. 35, n. 1, p. 205-215, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100034>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/PPsNVYzQPNNDKQ9MCr7fQPJ/?lang=en>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

NOGUEIRA, R. C. A. **Análise de Conversão de Imagem Colorida para Tons de Cinza Via Contraste Percebido**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Engenharia da Computação). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016. Disponível em: <https://www.cin.ufpe.br/~tg/2016-1/rcan.pdf>. Acesso em: 22 de julho de 2023.

PACIORNIK, S.; YALLOUZ, A. V.; CAMPOS R. C.; GANNERMAND, D. Scanner Image Analysis in the Quantification of Mercury using *Spot-Tests*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.17, n.1: p. 156-161, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000100022>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/jw9Cz39x3fsMr8K5vBDkggq/?lang=en>. Acesso em: 23 de junho de 2023.

PASSARETTI, J. F. **Análise de imagens digitais para fins analíticos: aplicações ambientais e tecnológicas**. Tese (Doutorado em Química). Univeridade Estadual Paulista. Instituto de Química. São Paulo, Araraquara, 2015. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/143007/000857374_20170828.pdf?sequence=1. Acesso em: 21 de junho de 2023.

PEREIRA, F. M.; BRUM, D. M.; LEPRI, F. G.; CASSELLA, R. J. Extraction induced by emulsion breaking as a tool for Ca and Mg determination in biodiesel by fast sequential flame atomic absorption spectrometry (FS-FAAS) using Co as internal standard. **Microchem. J.**, 117, 172, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.06.026>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X14001295>. Acesso em: 23 de julho de 2023.

PEREIRA, F. M.; ZIMPECK, R. C.; BRUM, D. M.; CASSELLA, R. J. Novel extraction induced by emulsion breaking as a tool for the determination of trace concentrations of Cu, Mn and Ni in biodiesel by electrothermal atomic

absorption spectrometry. **Talanta**, 117, 32, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.08.042>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914013007005>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

QUADROS, D. P. C.; RAU, M.; IDREES, M.; CHAVES, E. S.; CURTIUS, A. J.; BORGES, D. L. G. A simple and fast procedure for the determination of Al, Cu, Fe and Mn in biodiesel using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 66, p. 373-377, 2011.

RAMOS, L. P.; KOTHE, V.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; MUNIZ-WYPYCH, A. S.; NAKAGAKI, S.; KRIEGER, N.; WYPYCH, F.; CORDEIRO, C. S. Biodiesel: matérias-primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. **Ver. Virtual Químico**, cidade, v. 9, n. 1, p. 317-369, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sab.2011.04.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0584854711000656>. Acesso em: 2 de junho de 2023.

REZAZADEH, M.; SEIDI, S.; LID, M.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; YAMINI, Y. The modern role of smartphones in analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 118, p. 548–555, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.019>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993619300494>. Acesso em: 20 de junho de 2023.

REIS, P. K. ; SANTOS, M. C. ; CHAVES, E. S. . Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para determinação de Zn em óleos vegetais por FAAS. *In: XXIII Encontro de Química da Região Sul, 2016, Santa Maria. XXIII Encontro de Química da Região Sul, 2016. v. 1. p. 1-1.* Disponível em: https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/509/2019/06/Livro_de_resumos_SBQSul2016.pdf. Acesso em: 23 de julho de 2023.

REIS, P. K. **Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa assistida por vortex para determinação de Fe, Mg e Zn em óleos vegetais por espectrometria de absorção atômica.** Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. Paraná, Ponta Grossa. 2018. Disponível em: https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/16630/1/PG_COALM_2017_2_04.pdf. Acesso em: 5 de maio de 2023.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.-R. M.; AGHAEI, E.; FARDIN, A.; BERIJANI, S.. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, maio 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967306005280>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M.. Evolution of dispersive liquid-liquid

microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342–2357, abr. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.088>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967309017750>.

Acesso em: 22 de julho de 2023.

SANTANA, A.; OKAMOTTO, P. T.; BARBOZA, L. C.; SANTOS, C. A.; PAULA-FILHO, J. F.; ALVIM, P. C. R. C.; ENNES, M. W.; CHING, W. H.; RODRIGUES, C. W. **Biodiesel**. Brasília: Serviço brasileiro de apoio às micros e pequenas empresas, 2009.

SANTOS, J. L. **Estratégias analíticas para determinação de nitrito e nitrato em matrizes ambientais e alimentícias, empregando análise de imagens digitais**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal da Bahia. Bahia, Salvador. 2013. Disponível em:

<https://repositorio.ufba.br/handle/ri/15799>. Acesso em: 22 de junho de 2023.

SANTOS, L.K.; CALERA, G. C. STRINGACI, J. C. T. VILAÇA, S. M.; VIVIANI, V. E.; FLUMIGNAN, D. L. Estado Da Arte Da Aplicação Do Processo De Hidroesterificação Na Produção De Biodiesel A Partir De Matérias-Primas De Baixa Qualidade. **Principia**, n.28, João Pessoa. Universidade Estadual de São Paulo. São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em:

<https://periodicos.ifpb.edu.br/index.php/principia/article/viewFile/456/342>.

Acesso em: 24 de junho de 2023.

SANTOS, N. A.; CORDEIRO, A. M. T.; GONDIM, A. D.; DOS SANTOS, I. M. G.; MAIA, A. S. SOUZA, A. G. Efeito catalítico de metais de transição no processo oxidativo do biodiesel de soja avaliado pelos métodos Rancimat e PetroOxy. *In*: 7º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel. 2019 P 45-46. Disponível em:

<https://ubrabilio.com.br/2020/04/02/efeito-catalitico-de-metais-de-transicao-no-processo-oxidativo-do-biodiesel-de-soja-avaliado-pelos-metodos-rancimat-e-petrooxy/>. Acesso em: 24 de junho de 2023.

SARIN, A.; ARORA, R.; SINGH, N. P.; SHARMA, M.; MALHOTRA, R. K. Influence of metal contaminants on oxidation stability of Jatropha biodiesel. **Energy**, v. 34, p.1271-1275. 2009. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.energy.2009.05.018>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360544209002023>.

Acesso em: 24 de junho de 2023.

SHISHOV, A. Y.; NIKOLAEVA, L. S.; MOSKVIN, L. N.; BULATOV, A. V. Full automated spectrophotometric procedure for simultaneous determination of calcium and magnesium in biodiesel. **Talanta**, v. 135, p. 133-137, 2015.

SHISHOV, A.; VOLODINA, N.; SEMENOVA, E.; NAVOLOTSKAYA, D.; ERMAKOV, S.; BULATOV, A. Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction based on decomposition of deep eutectic solvent for the determination of lead and cadmium in vegetable oil. **Food Chemistry**, v. 373,

Part B,131456, 2022. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.12.014. Disponível em: 10.1016/j.talanta.2014.12.014. Acesso em: 25 de junho de 2023.

SILVA, K. R. N. **Avaliação da Microextração líquido-líquido dispersiva reversa como estratégia para o preparo de amostra de biodiesel para determinação de Ca, Mg, Na e K por espectrometria atômica.** Dissertação (Mestre em química). Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Dourados. 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufgd.edu.br/jspui/bitstream/prefix/1380/1/KassiaRobertaNogueiraSilva.pdf>. Acesso em: 23 de junho de 2023.

SOARES, S., LIMA, M. J. A., ROCHA, F. R. P. A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone. **Microchemical Journal**, 133, 195–199. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.029>. Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026265X16306051>. Acesso em: 23 de junho de 2023.

SOROURADDIN, S. M., FARAJZADEH, M. A., & OKHRAVI, T.. Application of deep eutectic solvent as a disperser in reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of Cd(II) and Zn(II) ions from oil samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 93. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103590>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889157520304701>. Acesso em: 03 de julho de 2023.

SOUZA, V. S.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; CERQUEIRA, U. M. F. M.; Bezerra, M. A. Determination of total contents and volatile and non-volatile fractions of nickel and vanadium in gasohol by graphite furnace atomic absorption spectrometry after extraction induced by emulsion-breaking. **Fuel**, 242, 479, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.12.129>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016236118321975>. Acesso em: 23 de junho de 2023.

SOUZA, R. M.de. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de elementos-traço em amostras oleosas e pastosas por ICP OES e ICP-MS.** Tese (Doutorado em Química) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/colecao.php?strSecao=autor&nrSeq=18416@1&nrseqaut=4637>. Acesso em: 25 de junho de 2023.

TAKASHIMA, G. M. S. ; CHAVES, E. S. ; MARANHÃO, T. A. . Microextração líquido-líquido dispersiva de fase reversa para a determinação de cobre, cromo e níquel em biodiesel por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica. *In*: 18o Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis. CD de Resumos 18o Encontro Nacional de Química Analítica, 2016. Disponível em: https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/UFSC_097032b1621635d6edc705f6db09c58e. Acesso em: 21 de junho de 2023.

TASISTRO, I. B. **Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para determinação Fe e Cu em óleo vegetal isolante**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais), Programa de Pós Graduação em Tecnologias Ambientais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná 2022. Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/30670>. Acesso em: 01 de agosto de 2023.

VIDAL, E.; LORENZETTI, A.; ALVAREZ, M.; DOMINI, C.; AGUIRRE, M. P.; VIDAL, L.; CANALS, A. Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for elemental analysis in gasoline by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 36, p. 2338–2345, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1JA00259G>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/ja/d1ja00259g>. Acesso em: 23 de junho de 2023.

WENDT, J. F. B. **Emprego da microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa como método verde de preparo de amostras de óleo mineral isolante para a determinação de Cu e Fe**. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais), Programa de Pós Graduação em Tecnologias Ambientais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, 2021. Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/29716>. Acesso em: 23 de junho de 2023.

ANEXO A - Lei n. 9.610, de 19 de fevereiro de 1998



Presidência da República
Casa Civil
Subchefia para Assuntos Jurídicos

LEI Nº 9.610, DE 19 DE FEVEREIRO DE 1998¹.

Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Título I - Disposições Preliminares

Art. 1º Esta Lei regula os direitos autorais, entendendo-se sob esta denominação os direitos de autor e os que lhes são conexos.

Art. 2º Os estrangeiros domiciliados no exterior gozarão da proteção assegurada nos acordos, convenções e tratados em vigor no Brasil.

Parágrafo único. Aplica-se o disposto nesta Lei aos nacionais ou pessoas domiciliadas em país que assegure aos brasileiros ou pessoas domiciliadas no Brasil a reciprocidade na proteção aos direitos autorais ou equivalentes.

Art. 3º Os direitos autorais reputam-se, para os efeitos legais, bens móveis.

Art. 4º Interpretam-se restritivamente os negócios jurídicos sobre os direitos autorais.

Art. 5º Para os efeitos desta Lei, considera-se:

I - publicação - o oferecimento de obra literária, artística ou científica ao conhecimento do público, com o consentimento do autor, ou de qualquer outro titular de direito de autor, por qualquer forma ou processo;

II - transmissão ou emissão - a difusão de sons ou de sons e imagens, por meio de ondas radioelétricas; sinais de satélite; fio, cabo ou outro condutor; meios óticos ou qualquer outro processo eletromagnético;

III - retransmissão - a emissão simultânea da transmissão de uma empresa por outra;

IV - distribuição - a colocação à disposição do público do original ou cópia de obras literárias, artísticas ou científicas, interpretações ou execuções fixadas e fonogramas, mediante a venda, locação ou qualquer outra forma de transferência de propriedade ou posse;

V - comunicação ao público - ato mediante o qual a obra é colocada ao alcance do público, por qualquer meio ou procedimento e que não consista na distribuição de exemplares;

VI - reprodução - a cópia de um ou vários exemplares de uma obra literária, artística ou científica ou de um fonograma, de qualquer forma tangível, incluindo qualquer armazenamento permanente ou temporário por meios eletrônicos ou qualquer outro meio de fixação que venha a ser desenvolvido;

VII - contrafação - a reprodução não autorizada;

VIII - obra:

a) em co-autoria - quando é criada em comum, por dois ou mais autores;

b) anônima - quando não se indica o nome do autor, por sua vontade ou por ser desconhecido;

c) pseudônima - quando o autor se oculta sob nome suposto;

d) inédita - a que não haja sido objeto de publicação;

e) póstuma - a que se publique após a morte do autor;

f) originária - a criação primígena;

g) derivada - a que, constituindo criação intelectual nova, resulta da transformação de obra originária;

h) coletiva - a criada por iniciativa, organização e responsabilidade de uma pessoa física ou jurídica, que a publica sob seu nome ou marca e que é constituída pela participação de diferentes autores, cujas contribuições se fundem numa criação autônoma;

i) audiovisual - a que resulta da fixação de imagens com ou sem som, que tenha a finalidade de criar, por meio de sua reprodução, a impressão de movimento, independentemente dos processos de sua captação, do suporte usado inicial ou posteriormente para fixá-lo, bem como dos meios utilizados para sua veiculação;

IX - fonograma - toda fixação de sons de uma execução ou interpretação ou de outros sons, ou de uma representação de sons que não seja uma fixação incluída em uma obra audiovisual;

X - editor - a pessoa física ou jurídica à qual se atribui o direito exclusivo de reprodução da obra e o dever de divulgá-la, nos limites previstos no contrato de edição;

XI - produtor - a pessoa física ou jurídica que toma a iniciativa e tem a responsabilidade econômica da primeira fixação do fonograma ou da obra audiovisual, qualquer que seja a natureza do suporte utilizado;

XII - radiodifusão - a transmissão sem fio, inclusive por satélites, de sons ou imagens e sons ou das representações desses, para recepção ao público e a transmissão de sinais codificados, quando os meios de decodificação sejam oferecidos ao público pelo organismo de radiodifusão ou com seu consentimento;

XIII - artistas intérpretes ou executantes - todos os atores, cantores, músicos, bailarinos ou outras pessoas que representem um papel, cantem, recitem, declamem, interpretem ou executem em qualquer forma obras literárias ou artísticas ou expressões do folclore.

Art. 6º Não serão de domínio da União, dos Estados, do Distrito Federal ou dos Municípios as obras por eles simplesmente subvencionadas.

¹ Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9610.htm.