

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS MEDIANEIRA**

EMILENE DE CARVALHO LOURENÇO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO EMPREGANDO
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE
REVERSA PARA DETERMINAÇÃO DE Na, K, Ca e Mg EM
BIODIESEL.**

DISSERTAÇÃO

MEDIANEIRA

2016

EMILENE DE CARVALHO LOURENÇO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO EMPREGANDO
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE
REVERSA PARA DETERMINAÇÃO DE Na, K, Ca e Mg EM
BIODIESEL.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologias Ambientais, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Medianeira.

Discente: Emilene de Carvalho Lourenço.

Orientador: Dr. Éder Lisandro de Moraes Flores.

Co-orientadores: Dr. Eduardo Eyng e Dra. Paola Azevedo Mello.

MEDIANEIRA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

L892d

LOURENÇO, Emilene de Carvalho

Desenvolvimento de método empregando microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para determinação de Na, K, Ca e Mg EM Biodiesel/ Emilene de Carvalho Lourenço – 2016.
70 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Dr. Éder Lisandro de Moraes Flores.

Coorientadores: Dr. Eduardo Eyng e Dra. Paola Azevedo Mello.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais. Medianeira, 2016.

Inclui bibliografias.

1. Biodiesel. 2. Fontes Alternativas. 3. Metais 4. Tecnologias Ambientais- Dissertações. I. Flores, Éder Lisandro de Moraes. orient. II. Eyng, Eduardo. coorient. III. Mello, Paola Azevedo. coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambientais. V. Título.

CDD: 600

Biblioteca Câmpus Medianeira
Fernanda Cristina Gazolla Bem dos Santos 9/1735



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus
Medianeira
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais



TERMO DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EM FASE REVERSA PARA DETERMINAÇÃO DE Na, K, Ca e Mg EM BIODIESEL

por

EMILENE DE CARVALHO LOURENÇO

Essa dissertação foi apresentada às 14:00 horas, do dia 02 de março de dois mil e dezesseis, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologias Ambientais, Linha de Pesquisa Tecnologias de Prevenção e Controle de Impactos Ambientais, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Éder Lisandro de Moraes Flores (Orientador – PPGTAMB)

Prof. Dr. Eduardo Eyng (Coorientador – PPGTAMB)

Prof^a. Dr^a. Rochele Sogari Picoloto (UFSM - RS)

Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte (UFSM - RS)

A folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa.

Dedico este trabalho integralmente aos meus irmãos Charles Willian Lourenço e Luana de Carvalho Lourenço, que me fazem a cada dia querer ser uma pessoa melhor e tornar o mundo melhor para que eles possam ser plenamente felizes. Eu os amo.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Medianeira, pela oportunidade de participação do programa e desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Éder Lisandro de Moraes Flores**, pela dedicação e paciência em orientar durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Eduardo Eyng**, pela participação e contribuições na qualificação e durante a execução do trabalho.

Ao Prof. Dr. **Fábio Andrei Duarte** pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. **Paola Azevedo Mello** pelo grande apoio nas atividades experimentais desenvolvidas em Santa Maria, RS.

Às alunas do laboratório de análises químicas industriais e ambientais – UFSM **Morgana Doneda e Lisarb de Oliveira Diehl** pelas contribuições durante os experimentos realizados em Santa Maria, RS.

À Prof^a. Dr^a. **Rochele Sogari Picoloto**, pela participação no exame de qualificação, defesa de dissertação contribuindo imensamente com sugestões e esclarecimento de dúvidas.

Ao Prof. Dr. **Paulo Rodrigo Stival Bittencourt** pela participação no exame de qualificação e pelas sugestões ao trabalho.

A todos meus colegas do PPGTAMB que me deram a oportunidade de conhecê-los e descobrir pessoas tão diferentes entre si, mas com objetivos e metas em comum.

À minha querida amiga **Franciele Natividade Luiz** por estar presente desde a graduação e seguir comigo nesse desafio. Obrigado pelo apoio, pelos esclarecimentos e principalmente pela paciência.

Às minhas queridas amigas **Naiara Costa Gil e Nilza Costa Gil** por confiarem na minha capacidade e me apoiarem nos momentos difíceis.

A Capes e a Fundação Araucária pelo auxílio com bolsa para o mestrado.

Aos meus familiares pelo carinho, apoio e incentivo.

“Os livros não mudam o mundo, quem muda o mundo são as pessoas.

Os livros só mudam as pessoas.”

(Mário Quintana)

RESUMO

Lourenço, Emilene C. **Desenvolvimento de método empregando microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa para determinação de Na, K, Ca e Mg em biodiesel**. 2016. 71 folhas. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2016.

Neste trabalho foi desenvolvido um método empregando a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME) como preparo de amostra, para extração e pré-concentração de Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel. A determinação dos analitos foi feita por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), operando no modo emissão para Na e K e absorção para Ca e Mg. Para executar a etapa de extração/pré-concentração dos analitos empregou-se uma mistura de dois solventes, um dispersor e um extrator, que foi adicionada em cada amostra em volumes e concentrações adequados. A extração dos analitos ocorreu após adição da mistura de dispersor-extrator e a fase sedimentada formou-se mediante centrifugação. Foram avaliados alguns parâmetros sobre a eficiência da extração como: massa de amostra (3, 5, 10 e 20 g), tipos de solvente dispersor e proporção (isopropanol, 60, 65, 70, 75, 80, 85% (v/v)), concentração da solução extratora (HNO_3 0,5; 1; 1,5 e 2 mol L⁻¹ (v/v)), volume da fase extratora (0,5; 1,0 ; 1,5 e 2 mL), tempo de centrifugação (5, 10 e 15 min) e temperatura (45, 55, 65 e 75 °C). Para todos os parâmetros avaliados e ajustados, foi feita a adição dos analitos (1,0 µg) nas amostras com dois padrões multielementares de biodiesel (2,5 e 20 µg g⁻¹ de Na, K, Ca e Mg), sendo os resultados expressos como recuperação (%). Para a determinação dos analitos por F AAS, foi feita calibração externa com soluções de referência aquosas. As curvas de calibração para Na, K, Ca e Mg foram lineares entre 0,1 e 2,0 mg L⁻¹. Os limites de quantificação para Na, K, Ca e Mg para este método foram 0,04; 0,02; 0,05 e 0,08 mg kg⁻¹, respectivamente. A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação e os valores obtidos entre 94 e 108% com RSD inferior a 5% para todos os analitos. O método foi aplicado a cinco amostras diferentes de biodiesel produzidos a partir de diferentes matérias-primas. O método desenvolvido foi considerado viável para a determinação de Na, K, Ca e Mg em biodiesel, atendendo os requisitos da Legislação Brasileira, que determina limites máximos de 5 mg k⁻¹ para a soma de Na e K e o mesmo limite para a soma de Ca e Mg. Como principais aspectos que caracterizam o método, destaca-se a simplicidade de operação, o baixo custo, baixo consumo de reagentes de acordo com os princípios da Química Verde, uso de equipamentos de fácil operação, alta frequência analítica, além de baixos limites de quantificação para determinação dos analitos por F AAS.

Palavras-chaves: RP-DLLME. Metais. Biodiesel. Espectrometria atômica.

ABSTRACT

Lourenço, Emilene C. **Developed a method for employing a reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for determination of Na, K, Ca and Mg biodiesel.** 2016. 71 folhas. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2016.

This research developed a method for employing reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME) as sample preparation for the extraction and pre-concentration of Na, K, Ca and Mg in biodiesel samples. The determination of analytes were executed through flame atomic absorption spectrometry (F AAS), operating in emission mode for Na and K and absorption mode for Ca and Mg. The extraction/pre-concentration step of the analytes was performed using a mixture of two solutions, a dispersing and an extractor, which were added to each sample in appropriate volumes and concentrations. The extraction of analytes occurred after the addition of the dispersing-extractor settled-phase mixture formed via centrifugation. Some parameters were evaluated on the extraction efficiency, such as: sample mass (3, 5, 10 and 20 g), different kinds of dispersant solvent and proportion (isopropanol, 60, 65, 70, 75, 80, 85% (v/v)), concentration of the extraction solution (HNO_3 0,5; 1;1,5 and 2 mol L^{-1} (v/v)), the volume of extraction phase (0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 mL), centrifugation time (5, 10 and 15 min) and temperature (45, 55, 65 and 75 °C). All the studied and adjusted parameters were made by analytes addition (1.0 μg) on the samples with two biodiesel multielemental standards (2.5 and 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ Na, K, Ca and Mg) whose results were expressed in recovery percentage (%). Due to the determination of analytes by F AAS, an external calibration was performed with aqueous reference solution. The calibration curves for Na, K, Ca and Mg were linear between 0.1 and 2.0 mg L^{-1} . The quantification limits of Na, K, Ca and Mg for this method were respectively: 0.04; 0.02; 0.05 and 0.08 mg kg^{-1} . The accuracy of the proposed method was assessed by recovery experiments and the values obtained were between 94% and 108% with RSD less than 5% for all analytes. The developed method was then applied to five different samples of biodiesel produced from different raw materials. Hence, the developed method was considered viable for the determination of Na, K, Ca and Mg in biodiesel, in accordance with the requirements of Brazilian regulation, which sets maximum limits of 5 mg k^{-1} for adding Na and K and the same limit for adding Ca and Mg. The main aspects that characterize this method are its simplicity in operation, low cost, low consumption of reagents according to the principles of green chemistry, easy operation equipment use, high analytical frequency, and low limits of quantification for the determination of analytes for F AAS.

Keywords: RP-DLLME. Metals. Biodiesel. Atomic spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de transesterificação de um triglicerídeo com um álcool.	19
Figura 2. Procedimento geral para DLLME.	25
Figura 3. Esquema geral de um espectrômetro de absorção atômica com chama. .	30
Figura 4. Procedimento RP-DLLME.	41
Figura 5. Efeito do uso de isopropanol e etanol como dispersores na recuperação de Na, K, Ca e Mg. Condições: volume da amostra: 10 g de biodiesel misto soja/sebo; Mistura de solventes: 75% (v/v) de dispersor e 25% (v/v) de solução de extrator HNO ₃ a 0,5 mol L ⁻¹ ; volume da mistura de extrator e dispersor: 1,0 mL; temperatura: 75 °C; banho de ultrassom: 10 min/75 °C e centrifugação (15 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).	43
Figura 6. Efeito do uso de ultrassom na recuperação de Na, K Ca e Mg. Condições: volume da amostra: 10 g de biodiesel misto soja/sebo; Mistura de solventes: 75% (v/v) de dispersor e 25% (v/v) de solução de extrator HNO ₃ a 0,5 mol L ⁻¹ ; volume da mistura de extrator e dispersor: 1,0 mL; temperatura: 75 °C e centrifugação (5, 10 e 15 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).	46
Figura 7. Efeito do uso de diferentes tempos de centrifugação na recuperação de Na, K, Ca e Mg. Condições: volume da amostra: 10 g de biodiesel misto soja/sebo; Mistura de solventes: 75% (v/v) de dispersor e 25% (v/v) de solução de extrator HNO ₃ a 0,5 mol L ⁻¹ ; volume da mistura de extrator e dispersor: 1,0 mL; temperatura: 75 °C e centrifugação (0, 5 e 10 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).	48
Figura 8. Efeito da proporção isopropanol na recuperação de Na, K, Ca e Mg. Condições: volume da amostra: 10g de biodiesel de soja/sebo; proporção do isopropanol: de 60% á 85% em relação à solução de solvente extrator HNO ₃ a 0,5 mol L ⁻¹ ; volume da mistura de extrator e dispersor: 1,0 mL; temperatura: 75 °C e centrifugação (15 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).	49
Figura 9. Ensaio de recuperação para avaliação da concentração de HNO ₃ . Condições: volume da amostra: 10g de biodiesel de soja/sebo; dispersor: 65% de isopropanol; extrator: variação de concentração de HNO ₃ de 0 a 2,0 mol L ⁻¹ ; volume da mistura de extrator e dispersor: 1,0 mL ; temperatura da amostra: 75 °C; centrifugação: (15 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).	51
Figura 10. Ensaio de recuperação para avaliação do volume mistura de solventes dispersor e extrator. Condições: volume da amostra: 10g de biodiesel de soja/sebo; dispersor: 65% de isopropanol; extrator: HNO ₃ a 0,5 mol L ⁻¹ ; volume da mistura de extrator e dispersor: de 0,5 a 2,0 mL ; temperatura da amostra: 75 °C; centrifugação: (15 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).	53
Figura 11. Ensaio de recuperação para avaliação do volume mistura dispersora/extratora. Condições: volume da amostra: 10g de biodiesel de soja/sebo; dispersor: 65% de isopropanol; extrator: HNO ₃ a 0,5 mol L ⁻¹ ; volume da mistura de extrator e dispersor: 1,0 mL ; temperatura da amostra: de 45 a 75 °C; centrifugação: (15 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matérias-primas usadas na produção de biodiesel no Brasil, relatório mensal (ANP 2015).	18
Tabela 2. Limites máximos para Na, K Ca e Mg em biodiesel. Método recomendado pela resolução ANP nº14/2012, para determinação desses elementos.	21
Tabela 3. Parâmetros instrumentais para determinação de Na, K, Ca e Mg.	38
Tabela 4. Teste Tukey (nível de confiança de 95%), avaliação do efeito do uso de ultrassom em ensaios de recuperação de Na, K, Ca, Mg.	46
Tabela 5. Teste Tukey (nível de confiança de 95%), avaliação do efeito de diferentes tempos de centrifugação na recuperação de Na, K, Ca e Mg.	48
Tabela 6. Teste Tukey (nível de confiança de 95%), avaliação do efeito de diferentes proporções de isopropanol na recuperação de Na, K, Ca e Mg.	50
Tabela 7. Teste Tukey (nível de confiança de 95%), avaliação do efeito de diferentes concentrações de HNO ₃ na recuperação de Na, K, Ca e Mg.	52
Tabela 8. Teste Tukey (nível de confiança de 95%), avaliação do efeito de diferentes volumes da mistura de solventes na recuperação de Na, K, Ca e Mg.	54
Tabela 9. Teste Tukey (nível de confiança de 95%), avaliação do efeito de diferentes temperaturas da amostra na recuperação de Na, K, Ca e Mg.	56
Tabela 10. Condições ajustadas para aplicação de metodologia de RP-DLLME para determinação Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel.	56
Tabela 11. Coeficiente de correlação linear, equação da reta e faixa linear da curva de calibração externa para Na, K, Ca e Mg.	57
Tabela 12. Parâmetros para determinação de Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel por espectrometria atômica com o emprego de RP-DLLME.	58
Tabela 13. Ensaios de recuperação em concentrações distintas. Adição de massa dos analitos 10 µg e 50 µg para Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel misto sebo/soja (n=3).	59
Tabela 14. Ensaios de recuperação e quantificação de Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel, aplicando metodologia otimizada empregando RP-DLLME por F AAS (n=3).	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

APROBIO, Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil

ASTM, American Society for Testing and Materials

DLLME, microextração líquido-líquido dispersiva do inglês, *dispersive liquid-liquid microextraction*

RSD, desvio padrão relativo

ET AAS, *espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica*, do inglês *electrothermal atomic absorption spectrometry*

F AAS, espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *flame atomic absorption spectrometry*

F AES, espectrometria de emissão atômica com chama, do inglês *flame atomic emission spectrometry*

GC-FID, cromatografia a gás com detector de ionização de chama, do inglês *gas chromatography-flame ionization detection*

HNO₃, ácido nítrico

HPLC, cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*

HR-CS F AAS, espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, do inglês *high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry*

ICP OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*

LD, limite de detecção

LLE, extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction*

LQ, limite de quantificação

LS F AAS, espectrometria *de absorção atômica* em chama com fonte de linhas, do inglês *line source atomic absorption spectrometry*

MAE, extração assistida por micro-ondas, do inglês *microwave-assisted extraction*

NIST, National Institute of Standards and Technology

NREL, National Renewable Energy Laboratory (EUA)

R^2 , coeficiente de correlação linear

RP-DLLME, microextração líquido-líquido dispersiva de fase reversa, do inglês *reverse phase dispersive liquid-liquid microextraction*

RRLC-DAD-MS, cromatografia líquida de alta resolução com detecção por arranjo de diodos e espectrometria de massas do inglês, *procedure coupled with rapid resolution liquid chromatography-diode array and mass spectrometry detection*

RSD, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

SPE, extração em fase sólida, do inglês *solid-phase extraction*

SPME, microextração em fase sólida do inglês, *solid-phase microextraction*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 BIODIESEL.....	17
2.1.1 Produção e consumo do Biodiesel no Brasil.....	17
2.1.2 Processo de Produção de Biodiesel.....	18
2.1.3 Principais Contaminantes em Biodiesel e nas Matérias-primas.....	19
2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS RECOMENDADOS pela Abnt PARA AMOSTRAS DE BIODIESEL.....	21
2.3 Microextração líquido-líquido dispersiva.....	24
2.4 Microextração líquido-líquido dispersiva de fase reversa (RP-DLLME).....	27
2.5 Espectrometria de absorção atômica com chama.....	29
2.5.1 Interferências em F AAS.....	31
2.6 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS PARA A TÉCNICA DE RP-DLLME.....	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 objetivos específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Instrumentação.....	36
4.2 Reagentes e materiais.....	36
4.3 Amostras.....	37
4.4 condições para DETERMINAÇÃO de Na, K, Ca E Mg POR Espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS).....	38
4.4.1 Calibração do equipamento.....	38
4.5 DETERMINAÇÃO dos parâmetros de influência para RP-DLLME.....	39
4.5.1 Massa de amostra.....	39
4.5.2 Adição de analitos nas amostras.....	39
4.5.3 Avaliação do solvente dispersor.....	39
4.5.4 Concentração do Solvente extrator.....	40
4.5.5 Temperatura das amostras e uso de ultrassom.....	40
4.6 Procedimento de RP-DLLME utilizado para determinação Na, K, ca, mg em biodiesel.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS EXTRAÇÃO EMPREGANDO RP-DLLME ..	42
5.1.1 Avaliação dos solventes dispersor e extrator.....	42
5.1.2 Avaliação da massa da amostra.....	44
5.1.3 Avaliação da influência do ultrassom.....	45
5.1.4 Tempo de centrifugação.....	47
5.1.5 Proporção de isopropanol na fase extratora.....	49
5.1.6 Concentração de HNO ₃ na fase extratora.....	50
5.1.7 Volume da fase dispersora/extratora.....	52
5.1.8 Temperatura.....	54
5.2 Condições para aplicação de rp-dllme em biodiesel.....	56
5.2.1 Curva de calibração e faixa linear para Na, K, Ca e Mg por F AAS.....	57
5.2.2 Limites de detecção e quantificação.....	57
5.2.3 Estudo da exatidão e precisão.....	58
5.3 Aplicação do método em biodiesel recuperação e quantificação dos analitos...59	59
6 CONCLUSÕES	62
7 REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a escassez dos recursos energéticos fósseis convencionais tem se tornado cada vez mais evidente e os impactos ambientais causados pelo seu uso têm se agravado. Assim, o uso de biocombustíveis vem ganhando destaque no cenário mundial por serem consideradas alternativas viáveis na redução dos impactos ambientais gerados pelas mais distintas atividades. O biodiesel apresenta algumas vantagens em relação aos combustíveis fósseis, como podendo ser obtido de óleos vegetais e/ou gorduras animais, ser biodegradável, reduzir as principais emissões atmosféricas presentes nos gases de combustão. Quando o biodiesel é misturado ao óleo diesel, pode reduzir a emissão de poluentes devido ao maior teor oxigênio, que contribui para combustão dos hidrocarbonetos recalcitrantes presentes no diesel (FONTANA, 2011). Além disso, o biodiesel possui alto ponto de fulgor e excelente lubrificidade, as quais são características importantes para o bom desempenho do mesmo em motores a combustão (KNOTHE et al., 2006).

Outra grande conveniência para a produção de biodiesel é a versatilidade quanto às possíveis matérias-primas, sua obtenção pode ser a partir do óleo de diversas espécies vegetais, tais como soja, girassol, milho, canola, dendê, coco, pinhão manso, cártamo, crambe e mamona. Gorduras animais também são usadas amplamente utilizadas, como sebo bovino ou suíno, além de óleo residual de cozinha. Além disso, estudos reportam o emprego de algas como potenciais produtoras de óleos para obtenção de biodiesel (SONG, et al., 2015; TRIVEDI et al., 2015; KORDULIS et al., 2015).

No Brasil, o uso de biodiesel foi regulamentado em 2005, através da Lei Federal nº 11.097, onde biodiesel é definido como: “Biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” (BRASIL, 2005).

Para garantir a qualidade do biodiesel é necessário estabelecer limites máximos para cada contaminante, que possa ser prejudicial ao meio ambiente, garantindo um menor impacto das emissões devido à sua queima. Além disso, que

garanta o desempenho, integridade do motor, segurança no transporte e manuseio do biodiesel (LÔBO et al., 2009).

Cabe à Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) regulamentar e especificar a qualidade do biodiesel. A Resolução ANP nº 14 estabelece a especificação (contida no regulamento técnico ANP nº 4/2012), quanto ao controle da qualidade a ser atendida pelos agentes que produzem e comercializam o produto em todo o território nacional (ANP, 2012).

A presença de metais em biodiesel deve ser constantemente monitorada, uma vez que substâncias oriundas dos processos de produção podem estar presentes no produto final. A presença de metais como Na, K, Ca e Mg em concentração superior a permitida, 5 mg/ kg^{-1} para Na+K e $5 \text{ mg/K para Ca+ Mg kg}^{-1}$, podem acarretar em danos aos motores (KNOTHE 2006; ANSARI et al., 2009).

No Brasil, a ABNT dispõe de métodos para determinação de Na, K, Ca e Mg em biodiesel estabelecendo limites máximos para a presença desses elementos. Nesse método, uma alíquota da amostra é diluída em xileno e os metais são determinados diretamente por espectrometria de absorção atômica com chama.

Essa metodologia por sua vez, possui desvantagens como: curva de calibração com alto custo com reagentes, consumo elevado de reagentes e tem por princípio a diluição da amostra que acaba por diminuir a concentração dos analitos. Para casos de analitos em baixas concentrações (abaixo ou próximo ao LD), podem não ser detectados devido aos altos limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método. Pelas limitações apresentadas, é indispensável o desenvolvimento de métodos que utilizem baixos volumes de reagentes, forneçam LD's e LQ's adequados e possam pré-concentrar os analitos para uma quantificação satisfatória devido a baixa concentração dos mesmos na amostra.

O preparo de amostras é considerado como parte principal de um método para que as amostras possam ser introduzidas aos equipamentos diminuindo as interferências que podem ser causadas pela matriz. Além disso, deve-se levar em consideração características como: exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação do método.

Para a determinação de Na, K, Ca e Mg, além dos métodos de preparo de amostra convencionais como a diluição em xileno, métodos alternativos podem ser empregados, dentre as quais destacam-se os que utilizam da microextração. Diversos métodos de extração de metais foram desenvolvidos recentemente para

diferentes amostras (EL-SHAHAWI e AL-SAIDI, 2013). O uso da microextração líquido-líquido dispersiva de fase reversa, foi descrito por Lopez-Garcia, et al. (2014) para extração direta de metais em amostras de óleo comestível.

A RP-DLLME é um método de extração onde a amostra orgânica é submetida a injeção rápida de uma mistura adequada de solventes dispersor e extrator (fase aquosa) promovendo a extração e pré-concentração dos analitos. O uso de solventes é mínimo e a fase aquosa sedimentada após centrifugação pode ser analisada diretamente em HPLC, ICP OES e FAAS (DAIRI et al., 2015; LIU et al., 2013; GODOY-CABALLERO et al., 2013)

Com o emprego desse método é possível reduzir erros resultantes dos procedimentos analíticos com muitos estágios, diminuir impactos sobre o meio ambiente e riscos ao operador. A redução do uso de solventes orgânicos é expressiva e pode ser traduzida no volume utilizado, e conseqüentemente no tratamento de resíduos. Assim, o desenvolvimento de métodos que empreguem a microextração está de acordo com os princípios da Química Verde referentes a geração de resíduos e uso de reagentes com menor toxicidade (FARIAS e FÁVARO, 2011; SPIETELUN et al., 2014).

A determinação e quantificação de Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel é indispensável uma vez que a ANP nº 14/2012 estabelece limites máximos para os mesmos. Este estudo propõe o desenvolvimento de um método para a determinação de Na, K, Ca e Mg em biodiesel empregando RP-DLLME e posterior determinação por F AAS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIESEL

Dentre as fontes de energias renováveis, os óleos vegetais apresentam grande potencial energético. Antigamente, os óleos eram usados como combustível, mas ao longo do tempo seu uso foi considerado inviável devido a problemas gerados principalmente nos motores à combustão (DEMIRBAS, 2007). Nos anos 70, surgiram as primeiras propostas para a transesterificação de óleos vegetais, cujo objetivo era melhorar as características desse combustível (RAMOS et al., 2011).

O biodiesel vem substituindo parcialmente os combustíveis fósseis e estudos recentes buscam avaliar seu potencial de produção com preocupação voltada à eminência de uma possível escassez de combustíveis fósseis. Nos EUA e na Europa usa-se para a produção de biodiesel o óleo de soja e de colza, já em países como a Índia é preferencialmente utilizado o pinhão manso (SARIN et al., 2009).

2.1.1 Produção e consumo do Biodiesel no Brasil

A escolha pela matéria-prima frequentemente depende de decisões políticas. O sebo bovino apresenta-se como menor custo dentre as opções, por ser um subproduto da agroindústria e por ter menor demanda no mercado (KNOTHE et al., 2006).

Quando a matéria prima para a fabricação de biodiesel for considerada resíduo de qualquer outra atividade, como é o caso do sebo bovino, confere a esse produto final maior importância em aspectos ambientais. O mercado consolidado para sebo é a fabricação de sabões e o excedente deve ser incinerado ou destinado a aterro sanitário. A integração do uso de resíduos de matadouros com produção de biodiesel vem minimizar impactos ambientais (CUNHA et al., 2009).

O relatório da ANP referente ao mês de dezembro de 2015 cita o funcionamento de 53 indústrias produtoras de biodiesel no Brasil com produção de 324.661 m³. Os dados referentes às matérias-primas utilizadas em todo território nacional estão na Tabela 1.

Tabela 1. Matérias-primas usadas na produção de biodiesel no Brasil, relatório mensal (ANP 2015).

Matérias-primas	Produção total (%)	m³
Óleo de soja	68,97	223.918,69
Gordura bovina	24,7	80.191,27
Óleo caroço de algodão	4,15	13.473,43
Gordura de porco	0,71	2.305,09
Óleo residual de fritura	0,44	1.428,51
Gordura de frango	0,05	162,3305
Outros materiais graxos	0,98	3.181,68
TOTAL		324.661

Fonte: Relatório mensal da ANP, dezembro de 2015.

Conforme a Medida Provisória nº 647 de 28 de Maio de 2014, ficaram estabelecidos percentuais obrigatórios de adição de biodiesel no óleo diesel de petróleo. Ficou estipulado a adição de 6% de biodiesel a partir de 1º de julho de 2014 e 7% a partir de novembro de 2014. Medida essa que alavancou a produção do biodiesel, sendo que em 2012 o Brasil foi considerado o segundo maior produtor de biodiesel do mundo (APROBIO, 2012).

2.1.2 Processo de Produção de Biodiesel

Entre os processos de obtenção de biodiesel destaca-se a transesterificação, que quando comparado a outros processos, é evidenciada a viabilidade pela qualidade e custo obtido. Atualmente, a transesterificação se consolidou como método universal na produção de biodiesel (DEMIRBAS, 2002; SALVI e PANWAR, 2012; OH et al., 2012).

O biodiesel que é obtido por transesterificação pela reação orgânica de um éster com um álcool, é transformado através da troca dos grupos alcóxidos. O processo ocorre pela mistura de um óleo que pode ser de origem animal ou vegetal com um mono-álcool, etanol ou metanol atuando com o uso de um catalisador. Uma mistura de glicerol e ésteres alquílicos é formada conforme a reação mostrada na Figura 1. A retirada do glicerol do biodiesel demanda longo período de repouso para que ocorra a separação das fases (KNOTHE et al., 2006; DEMIRBAS, 2005)

A reação de transesterificação com a adição de catalisador que pode ser homogêneo, heterogêneo ou enzimático (TARIQ et al., 2012; DEMIRBAS, 2005). A rota metálica em meio alcalino homogêneo é o processo mais usado para a obtenção de biodiesel e entre os catalisadores mais utilizados são o hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio (KNOTHE et al., 2006; RAMOS et al., 2011).

O catalisador para essa reação de transesterificação pode ser um ácido ou uma base. A reação utilizando a base é mais vantajosa, pois pode ser feita a temperatura ambiente. Enquanto a ácida necessita de altas temperaturas (DEMIRBAS, 2007; SALVI e PANWAR, 2012).

A transesterificação é, geralmente, feita com metanol, por ser um álcool considerado de baixo custo, tem maior reatividade e as dificuldades tecnológicas encontradas no processo de produção são menores (QUADROS et al., 2011). Na Figura 1 esta mostrada a reação de transesterificação. Os óleos vegetais brutos são mais usados na produção de biodiesel, mas outros materiais como sebo animal e óleos vegetais pós consumo em frituras vêm sendo utilizados na produção (FONTANA, 2011).

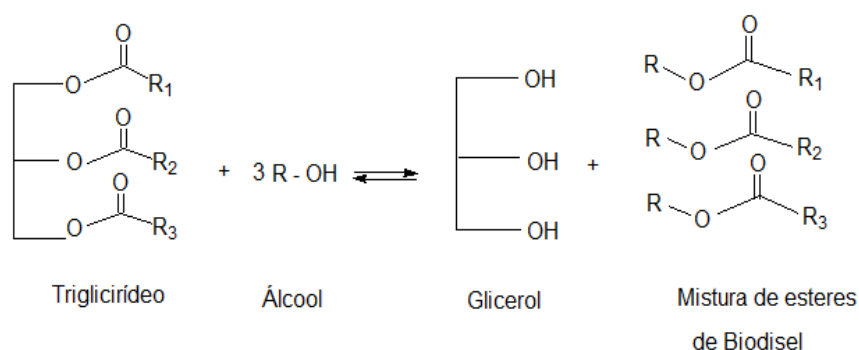


Figura 1. Transesterificação de um triglicérideo, processo para obtenção de biodiesel.

Fonte: Adaptada de RINALDI et al. (2007).

2.1.3 Principais Contaminantes em Biodiesel e nas Matérias-primas

Os metais presentes nos biodiesel têm origens diversas, podendo ser absorvidos pela planta a partir do solo, ou pelo uso de fertilizantes. A contaminação também pode ocorrer durante o processo de esmagamento dos grãos para obtenção do óleo, durante o processo de refinamento, pelo contato com equipamentos, armazenamento e transporte (KNOTHE, 2006). A contaminação de metais geralmente ocorre em baixas concentrações, mas suficientes para causar efeitos indesejáveis à qualidade do biodiesel. Sódio e potássio estão associados à formação de cinzas no motor e o cálcio e potássio são responsáveis pela formação de sabões que podem formar depósitos em peças do motor, principalmente na

bomba de injeção. A presença desses metais em biodiesel está relacionada com outros parâmetros de qualidade do biodiesel como, resíduos de carbono e teor de cinzas sulfatadas (BOZBAS, 2008; ANSARI et al., 2009; PRANKL et al., 2004).

Contaminantes como cálcio e magnésio, podem ter parte de sua origem incorporada ao processo produtivo durante as lavagens para purificação a partir do uso de águas duras. Esses elementos podem ser encontrados em concentrações variáveis no biodiesel, de acordo com sua origem e processo de produção. Elementos como P, S, Na, K, Ca e Mg são encontrados em amostras de biodiesel de origens diferentes e estão presentes em partes por milhão (QUADROS et al., 2011).

Elementos como Na, K, Ca e Mg, também podem ser incorporados durante o processo produtivo do biodiesel. Na e K são incorporados ao processo na forma de catalisadores para o processo de transesterificação. Podem estar presentes como contaminantes no produto final e propiciar a formação de sabões insolúveis, posteriormente causando depósitos nos filtros dos veículos (LISBOA et al., 2014; IQBAL et al., 2010; QUADROS et al., 2011).

Com relação à legislação relacionada a qualidade de biocombustíveis, a União Européia baseia-se na norma EN 14214 do *European Committee for Standardization* e os Estados Unidos na ASTM D6751 da *American Society for Testing and Materials* (ASTM). O Brasil tem normas distintas regidas pela resolução ANP nº 14/2012.

Na Resolução nº 14 da ANP são estabelecidos limites para a quantidade de alguns contaminantes e recomenda métodos analíticos específicos para determinação dos mesmos em biodiesel. Apesar das normas em outros países serem diferentes, há muitos pontos em comum (ANP, 2012). Elementos como Na, K Ca e Mg têm limites máximos, previstos na legislação, e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Limites máximos para Na, K Ca e Mg em biodiesel. Método recomendado pela resolução ANP nº14/2012, para determinação desses elementos.

Característica	Unidade	Limite máximo	Norma recomendada	
			ABNT NBR	EN/ISSO
Sódio + Potássio	mg kg ⁻¹	5	15553 *	14108 **
			15554 **	14109 **
			15555 **	14538 *
			15556 **	
Cálcio + Magnésio	mg kg ⁻¹	5	15553 *	14538 *
			15556 **	

Fonte: Adaptado de ANP (2012).

* Espectrometria de emissão ótica por plasma indutivamente acoplado.

** Espectrometria de absorção atômica com chama.

Na Europa e no Brasil as metodologias recomendadas para determinação de Na, K, Ca e Mg empregam a determinação desses elementos por F AAS, e Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES, do Inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Spectrometry*), (ABNT NBR 15553 e NBR 15556; EN 14108; EN 14109; EN 14538).

2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS RECOMENDADOS PELA ABNT PARA AMOSTRAS DE BODIESEL

Para determinação de Na, K, Mg e Ca a norma brasileira ABNT NBR 15556, utiliza como princípio a determinação por F AAS. Cerca de 1,0 g de amostra são pesados em frascos de polipropileno de 15 mL, diluído para 10 mL de xileno e homogeneizado. A curva de calibração é feita a partir de padrões organometálicos, com vaselina líquida em solução de xileno (ABNT NBR 15556, 2008). A diluição direta em xileno pode causar interferências na chama durante a determinação e formação de depósitos na tocha do ICP OES, devido ao alto teor de carbono residual.

Para a determinação de metais em baixas concentrações alguns equipamentos são considerados adequados como: ICP OES, F AAS, ICP-MS (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), pois possuem boa sensibilidade e seletividade, especificamente no ICP OES e ICP-MS. O processo de

diluição direta pode acarretar em interferências de medições uma vez que a matriz da amostra ainda estará presente e pode causar dificuldades, prejudicando a repetitividade de volumes (REYES e CAMPOS, 2006). A forma mais comum de evitar essas interferências é a decomposição da amostra por meio de digestão via úmida. Entretanto o procedimento pode prejudicar o limite de detecção do método, ocasionar perda dos analitos ou contaminações uma vez que a amostra será diluída (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2011; AMAIS et al., 2013)

Outras metodologias podem ser empregadas, como a pesquisa de Iqbal et al. (2010), que envolve digestão ácida no preparo de amostra e determinação por ICP OES para Na, K, Ca, Mg e outros metais em biodiesel. Amostras (0,25 – 0,50 g) foram submetidas a digestão ácida em sistema fechado com o uso de micro-ondas. Os frascos de digestão são confeccionados em Teflon[®] e são equipados com válvula de alívio de pressão excedente. Para a digestão, foram adicionados 9 mL de HNO₃ e 1 mL de HCl, ambos de grau analítico para todas as amostras. Aplicando, 600 W de potência até alcançar 175 °C, totalizando 10 min e resfriamento por 1 hora. Depois de digeridas as amostras, foram aferidas a 50 mL e a determinação foi feita por ICP OES. O RSD foi de 20% para amostras com baixa concentração dos analitos, o que sugere que massas maiores tenham que ser utilizadas, a metodologia se mostrou eficiente quando aplicada a ensaios de recuperação em amostras com maior concentração dos analitos o desvio padrão não ultrapassou 5%.

Recentemente, foi proposto por Lisboa et al. (2014), a determinação dos metais Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, Na, K e Si por meio de formação de emulsão das amostras de biodiesel com o uso de ácido fórmico e Triton X-100[®]. Os LDs (mg kg⁻¹) foram 0,121; 0,008; 0,006; 0,001; 0,006; 0,071; 0,241 e 0,024 para Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, Na, K e Si, respectivamente. A exatidão do método para o Ca, Mg, K e Na foi avaliada por meio da análise de um padrão multielementar de biodiesel B100 (Conostan[®]) e as recuperações variaram entre 91 a 107%. A determinação dos elementos propostos foi feita por ICP OES.

Em estudo realizado por Raposo et al. (2015), duas metodologias para determinação de Na, K e Ca em amostras de biodiesel foram avaliadas. A Primeira aplicando diluição direta em querosene e a segunda emulsificação usando solução aquosa de NH₄OH, n-butanol e Triton X-100[®]. O LQ para Na e K fora de 0,5 e 0,02 mg kg⁻¹, respectivamente empregando ambos os métodos. Para Ca o método de diluição direta apresentou LQ 0,2 mg kg⁻¹ e para emulsificação 1,0 mg kg⁻¹. As

recuperações obtidas para Na foram entre 94 e 108%, K entre 95 e 99% e Ca entre 89 e 103%. As amostras diluídas diretamente em querosene apresentaram instabilidade, observou-se a necessidade de que as fossem analisadas imediatamente após a diluição, enquanto o preparo por emulsificação apresentou limites de quantificação elevados para Ca. Todos os elementos foram determinados por espectrometria de emissão atômica com chama (F AES, do inglês *Flame Atomic Emission Spectrometry*).

Oliveira et al. (2012), viabilizaram em estudo a otimização e validação que dão suporte a norma ABNT NBR 15556 para determinação de Na, K, Mg e Ca por espectrometria de absorção atômica em chama com fonte de linhas (LS F AAS, do inglês, *Line Source Flame Atomic Absorption Spectrometry*). O estudo também comparou os resultados obtidos por LS F AAS e Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua (HR-CS F AAS, do inglês, *High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry*) comprovando a eficiência do método para ambos os equipamentos. A precisão do método pode ser avaliada com ensaio de recuperação, onde foram adicionados as amostras padrão misto dos elementos e os resultados de recuperação encontrados foram entre 91 e 107%.

Chaves et al. (2011), desenvolveram método para determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, S por diluição direta para amostras de biodiesel e óleos vegetais de diferentes procedências. A diluição com n-propanol, 10 e 20% (v/v) foi definida como ideal para ambos os tipos de amostras. A detecção multielementar pode ser feita em ICP OES. Para as amostras de biodiesel (0,20 g) a recuperação foi entre 87 a 116%, e para os óleos vegetais (0,45 g) 95 e 106%. O RSD foi inferior a 5% e o LD foi considerado baixo na casa de $\mu\text{g g}^{-1}$.

Os métodos usuais para determinação de metais em biodiesel, como a digestão via úmida e a diluição em xileno, apresentam desvantagens como: curva de calibração com alto custo, grandes quantidades de solventes orgânicos e equipamentos de custo elevado.

O uso de ICP OES é amplamente utilizado em análises de rotina por ser uma técnica multielementar e seu uso também se estende a amostras complexas. No entanto, a introdução direta de amostras com carga orgânica pode causar sobrecarga, extinção do plasma, instabilidade do sinal e deposição de resíduos de

carbono na tocha, desencadeado o mau desempenho do instrumento (IQBAL et al., 2010; GRINDLAY et al., 2006).

As técnicas citadas têm vantagens e desvantagens e, geralmente, são complementares, uma vez que apresentam limites de quantificação distintos. O grande desafio consiste principalmente em viabilizar a introdução de amostras de biodiesel nos equipamentos ICP OES, uma vez que amostras com alto teor orgânico entram em contato direto com o plasma. O desenvolvimento de metodologias que promovam tratamento de amostras orgânicas torna-se indispensável (QUADROS et al., 2011).

Apesar das técnicas existentes de preparo de amostras de biodiesel, diluição direta, microemulsão e digestão, Tranchida et al. (2015), ressaltam o crescimento do uso de técnicas de preparo de amostras alternativas consideradas corretas ambientalmente, como a extração assistida por micro-ondas (MAE, do Inglês, *Microwave-Assisted Extraction*), microextração em fase sólida (SPME, do Inglês, *Solid Phase Microextraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do Inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*).

2.3 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA

Com a evolução das técnicas de espectrometria atômica, a determinação de elementos em baixas concentrações tornou-se viável. Na maioria das vezes, as amostras para a introdução nesses equipamentos devem estar na forma aquosa. A etapa de preparo de amostras se torna indispensável quando a amostra não se encontra em solução aquosa e esse preparo demanda tempo, o qual pode durar desde minutos até horas. O consenso é que as etapas de preparo de amostras são responsáveis pelo maior custo e possíveis fontes de erros na determinação analítica (KRUG, 2008).

O cenário atual na área de preparo de amostras prioriza a qualidade dos resultados obtidos e desenvolvimento de técnicas que tenham foco em miniaturização e simplificação, o que resulta em menos gastos com reagentes e economia de tempo (RIOS et al., 2009; DADFARNIA et al., 2010).

A extração líquido-líquido (LLE, do Inglês, *Liquid-Liquid Extraction*), é frequentemente utilizada para preparo de amostras para extração de metais. No

entanto, a LLE é morosa, envolve volumes grandes de solventes orgânicos e em alguns casos o uso de solventes tóxicos. Para contornar o problema, várias outras técnicas foram adotadas, como a extração em fase sólida (SPE do inglês, *Solid-phase Extraction*) e a microextração em fase sólida (SPME, do Inglês, *Solid-phase Microextraction*). Nesse sentido, a partir dessas técnicas amplamente utilizadas, surgiu o uso da DLLME.

A DLLME é descrita na literatura com ampla aplicação em amostras biológicas, alimentos e água (REZAEI et al., 2010). O método é aplicado, a amostras aquosas contendo os analitos, onde serão adicionados um solvente dispersor (um solvente orgânico miscível com água), e um solvente extrator (apolar, imiscível em água e tipicamente mais denso que a água). Uma vez que as duas fases são imiscíveis, é função do solvente dispersor promover a rápida interação entre as fases, possibilitando ao solvente extrator permear sobre a amostra em pequenas gotículas extraíndo os analitos de maneira eficaz. A partição do solvente de extração em pequenas gotículas permite uma maior interação entre as fases acelerando o processo de extração. A separação é imediata sem a necessidade de agitação mecânica. Com o auxílio de um tubo cônico, a segunda etapa do procedimento de extração ocorre mediante centrifugação, formando uma fase orgânica sedimentada; que é então recolhida com auxílio de seringa ou pipeta para posterior determinação dos analitos (REZAEI et al., 2006; REZAEI et al., 2010; CALDAS et al., 2011). O procedimento para a DLLME está mostrado na Figura 2.

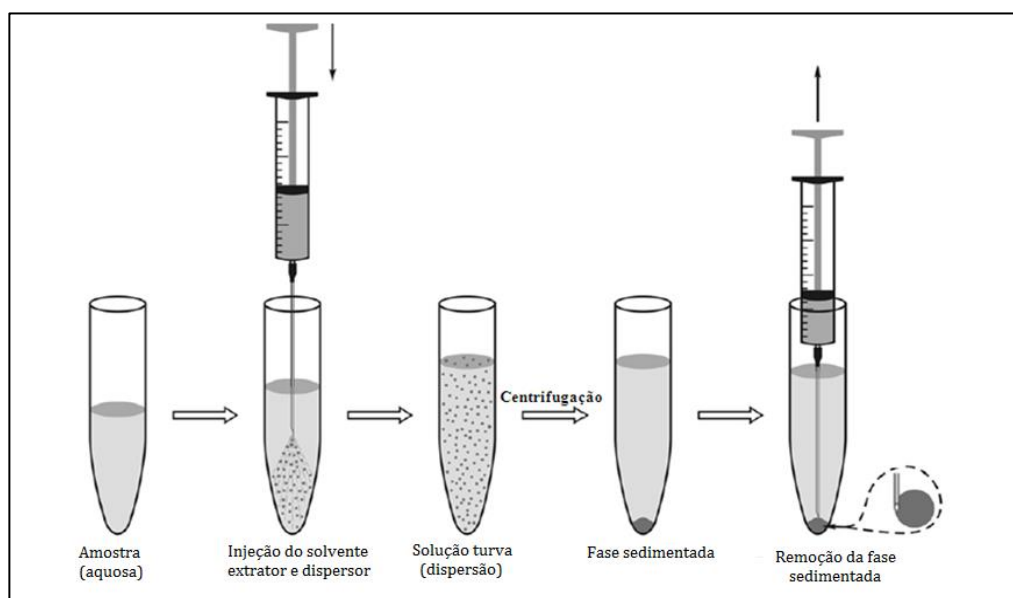


Figura 2. Procedimento geral para DLLME.

Fonte: Adaptado de Zgola-Grzeškowiak e Grzeškowiak (2011).

A DLLME é um método ainda em desenvolvimento. Rezaee et al. (2006), viabilizou a técnica, apresentando o primeiro estudo onde avaliou diferentes solventes extratores para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em amostras de água usando cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID, do inglês, *Gas Chromatography-Flame Ionization Detection*). As recuperações variaram de 60 a 111%. Desde então as vantagens associadas à técnica são inúmeras, pode-se elencar vantagens como: miniaturização do preparo de amostra, implicando em um menor custo e tempo, além da simplicidade operacional, alta recuperação e fatores de enriquecimento. Além disso, o uso da DLLME é enquadrada nos princípios da Química Verde (SPIETELUN et al., 2014), uma vez que utiliza reduzidos volumes de solventes orgânicos (FARAJZADEH et al., 2014).

É necessário, após a sedimentação, calcular a razão entre a porção da amostra e fase sedimentada, o que permite a obtenção dos valores de enriquecimento. Este expressa a eficiência da extração e pode ser calculado com a equação 1, onde C_{sed} e C_0 são, respectivamente, concentração da fase sedimentada em $\mu\text{g g}^{-1}$ e concentração inicial da amostra em $\mu\text{g g}^{-1}$.

$$FE = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad (1)$$

Equação 1: Fator de Enriquecimento
Fonte: MOREIRA et al. (2014).

Para determinação de Cd e Pb por FAAS em amostras de mel, Rosa et al. (2015), otimizaram o uso da DLLME avaliando parâmetros como: tipos de solvente extrator e dispersor, lavagem da fase sedimentada, volume do dispersor e extrator, massa da amostra, velocidade de centrifugação e uso de um complexante. Para a determinação de Cd obteve-se melhores resultados usando acetonitrila como dispersor enquanto para Pb, usou-se acetona. Para ambos os elementos tetracloreto de carbono foi usado como extrator.

Acetona, metanol, acetonitrila, tetrahidrofurano e etanol têm sido amplamente usados como solventes dispersores na DLLME. Já os extratores comumente usados para extração e pré-concentração de íons metálicos tem sido tetracloreto de carbono, clorobenzeno, clorofórmio, xileno e líquidos iônicos (AL-SAIDI e EMARA 2011).

2.4 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA DE FASE REVERSA (RP-DLLME)

A microextração líquido-líquido dispersiva de fase reversa diferencia-se justamente por ser contrária a DLLME comum, ou seja, a fase orgânica não é mais o extrator, e sim amostra; e o solvente extrator passa a ser a fase aquosa (M.P. GODOY-CABALLERO et al., 2013). Esse princípio abrange um campo maior da aplicação da DLLME, pois analitos podem estar tanto na fase apolar quanto polar, e a extração é feita com seletividade e com base na polaridade. Os analitos presentes na fase orgânica serão arrastados pela fase aquosa contendo os solventes extratores e dispersores, onde ficam na fase sedimentada após a etapa de centrifugação. Devido à diferença de densidade, essa fase sedimentada é recolhida e pode ser introduzida no equipamento para determinação dos analitos (LÓPEZ-GARCIA et al., 2015). O emprego de RP-DLLME confere ao método alto fator de enriquecimento dos analitos, simplicidade no preparo de amostras com segurança e capaz de transferir analitos da matriz para uma fase aquosa usando baixo volume de solvente extrator e velocidade no preparo de amostras.

Até o momento, a RP-DLLME ainda é pouco conhecida e as pesquisas na área ainda estão em desenvolvimento. São poucos os artigos publicados empregando a técnica, por se tratar de uma técnica desenvolvida recentemente. Para a determinação de metais, a técnica limita-se a apenas um artigo, com aplicação para a determinação de Cd e Pb em amostras de óleos comestíveis.

Alguns autores sugerem extração líquido-líquido seguida de microextração líquido-líquido dispersiva (LLE-DLLME, do inglês, *Liquid-liquid Extraction Followed by a Dispersive Liquid-liquid Microextraction*) para aplicação em amostras orgânicas, a primeira fase envolveria o preparo da amostra por LLE com o uso de grande volume de solvente orgânico como agente extrator. Essa fase por sua vez considerada aquosa seria então destinada ao DLLME convencional. Liu et al. (2013), fez o uso dessa técnica comparando-a com RP-DLLME para determinação de bisfenol A por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*), em amostras de óleos comestíveis. O LD do método foi de 6,3 e 2,5 ng g⁻¹ e os resultados de recuperação em amostras reais variaram de 90 a 98%. Ressalta-se a maior eficiência da última técnica uma vez que

o uso de solvente foi significativamente reduzido, gerando menos resíduos e a fase aquosa pode ser diretamente inserida no equipamento de detecção do analito.

Compostos fenólicos em óleos de oliva foram extraídos empregando RP-DLLME e detectados por cromatografia líquida rápida e de alta resolução com detecção por arranjo de diodos e espectrometria de massas (RRLC-DAD-MS, do inglês, *Procedure Coupled With Rapid Resolution Liquid Chromatography-Diode Array And Mass Spectrometry Detection*). Como extrator utilizou-se uma solução de etanol: água 60:40 (v/v) e 1,4-dioxano como dispersor. Os limites de detecção variando de 10 a 400 ng mL⁻¹ e de 1 a 200 ng mL⁻¹, para dezoito compostos diferentes. Método esse que demonstrou confiabilidade e resultados expressivos quando comparadas a técnicas convencionais de preparo de amostras para determinação dos mesmos compostos (M.P. GODOY-CABALLERO et al., 2013).

Em estudo realizado por Hashemi et al. (2010), utilizou-se RP-DLLME, com o intuito de pré-concentrar e determinar diretamente por HPLC, oleuropeína (principal glicosídeo) em águas residuais do processo de obtenção de azeite de oliva. A otimização realizada por ferramenta DCCR resultou na recuperação da extração média de 102 % ($\pm 4,5$). O fator de enriquecimento obtido foi superior a 38 e o LD 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O mesmo autor Hashemi et al. (2011), aplicou RP-DLLME para a determinação de tirosol e hidroxitirosol em óleo virgem de oliva obtendo resultados igualmente satisfatórios. Foram usados como solvente dispersor acetato de etilo (0,2 mL) e como extrator água com pH 11 (100 μL). Os resultados de recuperação foram de 98 e 104% para hidroxitirosol e tirosol, e o LD 0,043 mg L⁻¹ e 0,032 mg L⁻¹, respectivamente.

Recentemente foi estudado o uso de RP-DLLME para a extração de arsênio solúvel em água em diferentes amostras de óleos comestíveis. Os valores encontrados de recuperação para As foram entre 93 e 98%. O método otimizado empregou o uso de isopropanol como solvente dispersor e HNO₃ 3% (v/v) como solvente extrator, aplicados a 10 g de amostra. Todas as determinações foram realizadas em espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS, do inglês, *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*), usando paládio como modificador químico. O limite de detecção encontrado foi de 0,03 ng g⁻¹ de óleo (LÓPEZ-GARCIA et al., 2015).

López-García et al. (2014), publicou dados referente a pesquisa com o emprego de RP-DLLME em amostras de óleo comestível com o objetivo de determinar concentração de Pb e Cd. O solvente extrator escolhido foi solução de HNO₃ a 3% (v/v), disperso em isopropanol (75%, v/v). Amostras de 10 g foram submetidas à RP-DLLME e as recuperações encontradas foram 98% para Pb e 101% para Cd, com fator de enriquecimento de 140 e 146, respectivamente. Os limites de detecção para Cd e Pb foram de 0,6 e 10 ng kg⁻¹. Para a determinação elementar utilizou-se ETAAS. Ressalta-se o uso de temperatura de 80 °C, antes da extração e durante o período de aplicação do banho de ultrassom. Tanto a temperatura quanto o banho de ultrassom foram empregados com a finalidade de minimizar os efeitos causados pela viscosidade da amostra.

2.5 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA

A F AAS é uma técnica amplamente utilizada em para a determinação de metais e alguns não metais em diversos tipos de amostras. A técnica foi desenvolvida na década de 1950 por Walsh e, desde então, a instrumentação envolvendo F AAS passou por uma série de melhorias tecnológicas, sendo usada em milhares de publicações reportando o seu uso amplo, o que também colaborou para a sua grande difusão em laboratórios de controle de qualidade e de pesquisa. As aplicações empregando F AAS compreendem a determinação de aproximadamente 70 elementos químicos (L'VOV, 2005). Um esquema geral de um equipamento usado em F AAS está mostrado na Figura 3.

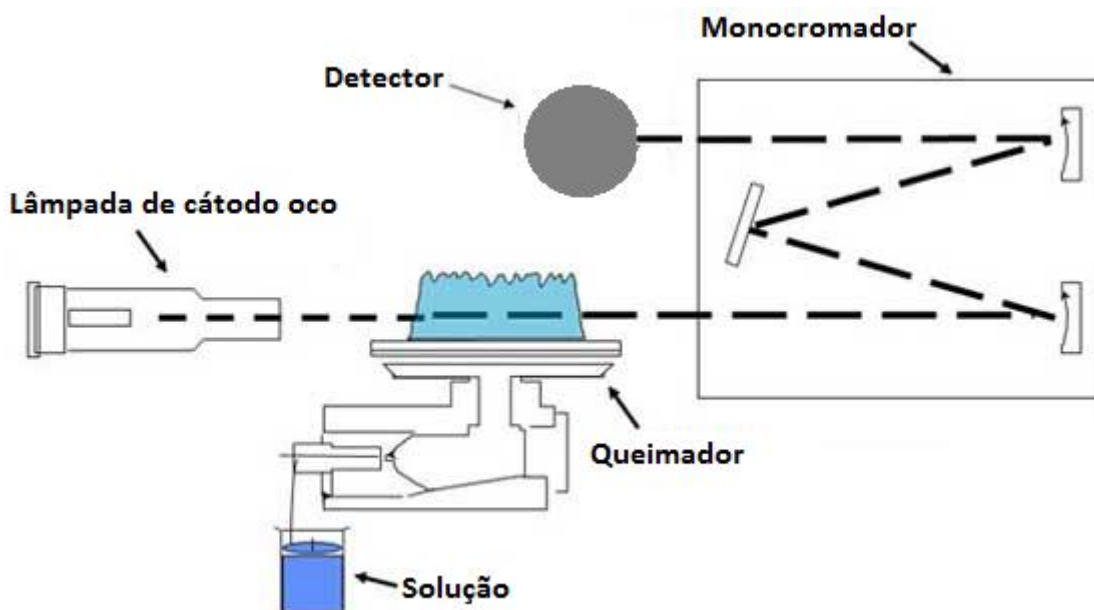


Figura 3. Esquema geral de um espectrômetro de absorção atômica com chama.

Fonte: Adaptado de Hind (2011).

Na espectrometria de absorção atômica a detecção e/ou quantificação de elementos químicos é baseada na medida da intensidade de sinais devido ao processo de absorção atômica, emissão atômica ou fluorescência atômica, conforme o elemento a ser determinado e a faixa de concentração. A grande maioria dos métodos empregando F AAS tem sido para determinações por absorção atômica. Uma vez que a grande maioria dos elementos pode ser quantificada com boa sensibilidade neste modo de operação (WELZ, 1999). Entretanto, alguns elementos, como por exemplo, Na e K são frequentemente determinados por emissão atômica.

A forma mais usual de introdução de amostras em equipamentos de F AAS é na forma de soluções, normalmente após a amostra originalmente sólida ou líquida passar por um procedimento de preparo de amostras, como por exemplo, decomposição por via úmida ou via seca, extração, dentre outros (SNEDDON, 2012). A solução é aspirada para uma chama ar/acetileno ou N_2O /acetileno a uma temperatura de 2000 a 3000 K por meio de um sistema de nebulização. Ao ser aspirada, a amostra é imediatamente misturada ao combustível (acetileno) e ao oxidante (ar comprimido ou N_2O) e logo em seguida é dispersa na forma de um aerossol, onde apenas uma pequena fração deste aerossol atinge a chama. A amostra passa por uma série de processos rápidos na chama, como dessolvatação, dissociação, atomização e ionização. Os átomos e íons formados podem ainda ser

excitados pela própria chama e emitir radiação que será detectada e também absorver radiação de uma fonte de linhas alinhada com o queimador e com um sistema de detecção (EBDON & EVANS, 1998).

No modo de determinação por emissão atômica a intensidade de luz emitida em um determinado comprimento de onda será proporcional à concentração do analito presente na solução presente na chama. Na absorção atômica é indispensável uma fonte de linhas que promoverá o processo de absorção atômica causado pela absorção de radiação com energia específica que atinge os átomos formados na chama. O uso dessas técnicas é considerado uma ferramenta indispensável na área da química analítica, devido a sua alta exatidão, precisão, sensibilidade, seletividade, frequência analítica elevada e baixo custo relativo (LAJUNEN & PERÄMÄKI, 2004).

De maneira geral, usualmente são necessários alguns ajustes para estabelecer condições de operação do equipamento que resultem em medidas com boa sensibilidade e exatidão. A taxa de aspiração, a estequiometria da mistura de oxidante e combustível da chama, corrente da lâmpada de cátodo oco, posição queimador em relação à fonte e ao detector, estão entre os principais parâmetros que devem ser ajustados. Assim, como a grande maioria dos espectrômetros, é necessária uma calibração preliminar, que é feita com soluções preparadas com concentrações conhecidas do analito. Essa calibração pode ser externa ou por adição de analito, quando a primeira não for possível (EBDON & EVANS, 1998).

2.5.1 Interferências em F AAS

As determinações por F AAS também são sujeitas a erros aleatórios e/ou sistemáticos. Dentre os erros sistemáticos, podem ocorrer fenômenos denominados interferências que, dependendo da sua magnitude, resultam em erros de exatidão nas determinações por F AAS. Essas interferências são classificadas em espectrais, físicas, de ionização e químicas (WELZ, 1999).

As interferências espectrais ocorrem normalmente devido à sobreposição de linhas atômicas, onde dois elementos absorvem radiação no mesmo comprimento de onda. Além disso, a presença de espécies moleculares na chama pode acarretar em absorção da radiação da fonte, processo denominado sinal de fundo ou background, que resulta em erros no sistema de detecção do equipamento (LAJUNEN & PERÄMÄKI, 2004).

As interferências físicas são causadas por diferenças de viscosidade e tensão superficial, originárias do uso de diferentes solventes ou soluções com acidez ou basicidade muito distintos entre as soluções de calibração e as soluções das amostras. O principal efeito das interferências físicas consiste em taxas de aspiração e processos de nebulização discrepantes entre as soluções de calibração e amostras (SNEDDON, 2012).

As interferências de ionização geralmente ocorrem na chama, pela ionização excessiva do analito em determinadas condições. Esse tipo de interferência resulta em diminuição da população de átomos no estado fundamental, que são as espécies responsáveis pela absorção da radiação da fonte (MANNING & CAPACHO-DELGADO, 1966).

As interferências químicas podem ocorrer devido à combinação do analito com outras espécies químicas formando compostos termoestáveis, impossibilitando a formação de átomos livres do analito, resultando em diminuição do processo absorção atômica e do respectivo sinal analítico (RAMAKRISHNA et al., 1968).

Essas interferências podem ser corrigidas com a adição de íons de elementos com maior facilidade de ionização às amostras. Soluções contendo íons dos elementos Cs, Li, La e Rb ou suas misturas são comumente usados com duas funções (WELZ, 1999):

- (i) supressores de ionização: para a determinações de Na e K, íons de Cs são adicionados em excesso, se ionizando na chama prioritariamente e deixando a chama rica em elétrons, minimizando a ionização dos analitos (Na e K);
- (ii) agentes libertadores: para a determinação de Ca e Mg, íons La são adicionados em excesso se combinando com outras espécies que podem estar presentes na chama, como íons PO_4^{3-} , evitando a formação de compostos termoestáveis, como fosfatos de Ca e Mg.

Para corrigir as interferências químicas citadas anteriormente foi proposto por Schuhknecht e Schinkel (1963), o uso de solução contendo a mistura de CsCl e $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ para a determinação de metais alcalinos (Na, K e Li). Posteriormente, Schinkel (1984), propôs o uso de uma solução contendo a mistura de LaCl_3 e CsCl, a qual ampliou a correção deste tipo de interferência para os seguintes elementos: Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Sr e Zn. Desde então, a solução

contendo a mistura de LaCl_3 (100 g L^{-1}) e CsCl (10 g L^{-1}), denominada “tampão espectroscópico”, adicionada às amostras e soluções de referência com concentração final entre 0,1 e 0,5% (v/v).

2.6 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS PARA A TÉCNICA DE RP-DLLME

Nas técnicas DLLME e RP-DLLME deve-se considerar alguns parâmetros que influenciam no processo de extração e pré-concentração, dentre eles a escolha do solvente extrator, escolha do solvente dispersor, efeito do volume dos solventes extrator e dispersor, efeito do tempo, força iônica, temperatura das amostras, entre outros (REZAEI et al., 2010; FARAJZADEH et al., 2014; CALDAS et al., 2011; LOPEZ-GARCIA et al., 2014).

O solvente extrator deve ser selecionado tendo como base o objetivo analítico do método, sempre levando em consideração a capacidade do solvente extrator de extrair o analito, e que necessariamente tenha diferença de densidade com a amostra, pois caso contrário a etapa de centrifugação não será eficiente (FARAJZADEH et al., 2014).

A escolha do solvente dispersor tem como fundamental característica ser solúvel tanto na fase polar quanto na apolar. O volume de dispersor está relacionado diretamente com a formação da solução turva quando aplicado à amostra, consequentemente afetando a eficiência da dispersão do solvente de extração e a eficiência da extração. Volumes muito reduzidos podem acarretar em extração incompleta, e em excesso promove a solubilidade do solvente extrator na amostra, propiciando um processo de extração ineficiente (LIANG e SANG, 2008; MARTINS et al., 2012).

Segundo Cheng et al. (2010) e Jahromi et al. (2007) o tempo de extração é definido como intervalo entre a injeção da mistura de solvente dispersor e a centrifugação. Esses mesmos autores consideram essa variável insignificante, pois o processo é rápido e não vem interferir extração dos analitos.

O uso de ultrassom em ensaios de extração aplicando DLLME já foram estudados e comprovados sua eficiência mediante revisão feita por Audruch et al. (2013). Extrações que envolvam transferências da fase orgânica para fase aquosa são mais favorecidas pelo uso de ultrassom, não existem estudos suficientes para

permitir que regras gerais sejam estabelecidas para os procedimentos de extração assistidos por ultrassom (CASTRO e CAPOTE, 2007).

Vários autores discutiram a influência do tempo e velocidade de rotação para a centrifugação na eficiência da separação da fase sedimentada e na recuperação dos analitos. Os tempos e velocidades obtidas por esses autores são distintos variando conforme a amostra, solventes e analitos. Para a determinação de piretróides em óleos vegetais, foram utilizados 5 minutos de centrifugação a 10000 rpm. Os autores apontaram que tempos inferiores a 4 minutos promoveram a separação incompleta da fase sedimentada tornando a mesma menor e mais difícil de ser extraída (FARAJZADEH, et al., 2014).

Na determinação de bisfenol A em amostras de óleos comestíveis, Liu et al. (2013), investigaram tempos de 2 a 10 min com velocidade fixada a 5000 rpm. Onde tempos superiores a 3 minutos não obtiveram melhores resultados. Ficando assim definidos 3 min e velocidade de rotação de 5000 rpm. Em estudo realizado por Hashemi et al. (2010), utilizou-se RP-DLLME para determinar oleuropeína em águas residuais do processo de obtenção de azeite de oliva, a velocidade de centrifugação foi mantida a 3000 rpm e o tempo foi estudado de 3 a 6 min, onde não houve comprovação de melhora dos resultados em nenhum dos tempos.

O aquecimento de amostras foi aplicado recentemente em amostras de óleos comestível para a determinação de As solúvel em água (LOPEZ-GARCIA, et al., 2015) e para determinação de Cd e Pb (LOPEZ-GARCIA, et al., 2014) também em amostras de óleos comestíveis. Ambos os trabalhos utilizaram temperatura de 80 °C com a finalidade de melhorar dispersão e promover extração e pré-concentração com maior eficiência em amostras viscosas.

3 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivo desenvolver um método empregando a RP-DLLME para posterior determinação de Na, K, Ca e Mg em biodiesel por F AAS.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, os principais parâmetros de influência serão estudados e ajustados, com a finalidade comprovar a aplicabilidade do método proposto para amostras de biodiesel comercial.

- Selecionar o solvente dispersor e volume adequados para o método RP-DLLME proposto;
- Selecionar o solvente extrator, concentração e volume ideal do mesmo;
- Verificar a influência do uso de ultrassom para a extração de Na, K, Ca e Mg das amostras de biodiesel;
- Estudar massa de amostra mais adequada, que pode ser usada no método;
- Estudar o efeito temperatura para recuperação dos analitos;
- Avaliar o tempo da etapa de centrifugação;
- Determinar o volume da mistura dispersor/extrator;
- Determinar LD e LQ instrumental e do método;
- Estabelecer a faixa linear de trabalho para F AAS;
- Avaliar a exatidão do método proposto para determinação de Na, K, Ca e Mg;
- Determinar Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel produzidas a partir de diferentes matérias-primas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

A determinação de Na, K, Ca e Mg foram feitas em um espectrômetro de absorção atômica com chama (Varian, modelo AA 240FS, Austrália). Sódio e potássio foram determinados por espectrometria de emissão atômica e Ca e Mg por espectrometria de absorção atômica. Utilizou-se lâmpadas de cátodo oco com corrente recomendada pelo fabricante.

Na etapa de microextração utilizou-se banho de ultrassom (Elma, modelo Elmasonic P 60 H, capacidade 5,75 (potência efetiva de 180 W, Alemanha) com ajuste de temperatura. Todas as amostras foram submetidas à etapa de separação em centrífuga (Cientec, CT-5000R, Brasil) com capacidade para 12 tubos de 15 mL e velocidade máxima de 5600 g.

Os procedimentos de pesagem das amostras foram feitos em uma balança de precisão (Marte, modelo AW 220, Brasil) com resolução de 0,0001 g e capacidade máxima de 220 g. Para o procedimento de RP-DLLME e para preparação de soluções foram utilizados micropipetadores automáticos (Brand, modelo Transferpette[®] S, Alemanha), com volumes variáveis entre 10-100 e 100-1000 μ L.

Para a análise estatística dos dados obtidos por meio de experimentos foi utilizado o programa *Microsoft Excel 2010*[®] com auxílio do suplemento *Action Stat*[®], onde foram desenvolvidos os testes *t-student* e teste *Tukey*.

4.2 REAGENTES E MATERIAIS

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

Para as curvas de calibração, foram utilizadas soluções de referência individuais contendo de 1000 mg L^{-1} de Na, K, Ca e Mg (Specsol[®], Brasil). Foram preparadas as soluções com diluições sucessivas para os diferentes pontos da

curva de calibração a partir de uma solução mista de 100 mg L^{-1} preparada a partir das soluções originais.

Em todas as soluções de referência e amostras foram adicionados solução de Schinkel, com concentração final de 0,5 % (v/v) composto de CsCl 10 g L^{-1} e LaCl 100 g L^{-1} (Fluka, Alemanha).

Tubos de polipropileno de 15 mL (Sarstedt, Brasil) com fundo cônico e tampa de rosca para uso em centrifugas foram utilizados nas etapas de preparo de amostras que compreende a pesagem da amostra, aquecimento em banho-maria, adição da mistura de solventes e centrifugação.

Os materiais utilizados foram devidamente lavados e descontaminados com solução de HNO_3 a 10% (v/v) preparado a partir de HNO_3 P.A (65%, Vetec, Brasil), todos os materiais foram secos em temperatura ambiente. O HNO_3 P.A (65%, Merck, Alemanha) usado como solvente extrator, foi bidestilado em um sistema de sub-ebulição (modelo duoPUR[®] 2.01E, Milestone, Itália). O isopropanol P.A (95%, Vetec, Brasil) foi utilizado no preparo das soluções com as diferentes proporções de dispersor.

O padrão multielementar de biodiesel B100 (Conostan[®], Canadá) foi utilizado, um com $2,5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ e outro com $20 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ dos elementos Ca, K, Mg, Na e P. Este padrão é rastreada pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, do Inglês, *National Institute of Standards and Technology*).

4.3 AMOSTRAS

Todas as amostras foram cedidas por empresas ativas no ramo de produção industrial de biodiesel, produzidas por rota metálica e com uso de hidróxido de sódio como agente catalizador. As mesmas foram catalogadas com dados referentes à planta de produção, data, lote e matéria-prima. Dentre as amostras para o desenvolvimento da pesquisa, foram utilizadas preferencialmente as de biodiesel misto, 50% soja e 50% sebo bovino, por ser o biodiesel mais produzido em território nacional. Todos os ensaios preliminares, até serem expostas as condições ideais de aplicação do método, foram realizados utilizando apenas a amostra de sebo/soja denominada “amostra 1”.

As amostras foram acondicionadas sob refrigeração (4 °C), tomando sempre o cuidado para que antes do preparo de amostras fossem deixadas em temperatura ambiente e homogeneizadas.

4.4 CONDIÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DE Na, K, Ca E Mg POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (F AAS)

As condições para determinação dos elementos seguiram recomendações do fabricante do F AAS, sendo que alguns ajustes foram feitos para melhoria das condições de medição. Os elementos Ca e Mg foram detectados por absorção, enquanto que os elementos Na e K por emissão atômica. Para a determinação de todos analitos do estudo foram utilizados como combustível acetileno (White Martins, pureza 99,8%) e como oxidante ar comprimido. Os parâmetros instrumentais utilizados estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros instrumentais para determinação de Na, K, Ca e Mg.

Parâmetro	Na	K	Ca	Mg
Comprimento de onda (nm)	589,0	766,5	422,7	285,2
Fenda espectral (nm)	0,5	1,0	0,5	0,5
Corrente da lâmpada (mA)	-	-	8	4
Vazão de ar (L min⁻¹)	10	10	10	10
Vazão de acetileno (L min⁻¹)	2,2	2,2	2,2	2,2

4.4.1 Calibração do equipamento

Para a calibração do equipamento, usou-se calibração externa feita a partir de soluções de referência aquosas foram preparadas com adição de 0,5% de HNO₃ concentrado bi-destilado e 0,5% de solução de Schinkel. As soluções mistas usadas para calibração foram: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ de Na, K, Ca e Mg.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE INFLUÊNCIA PARA RP-DLLME

4.5.1 Massa de amostra

Foram avaliadas massas de amostra de 3,0; 5,0; 10,0 e 20,0 g, que foram submetidas a ensaios usando RP-DLLME para avaliar a detecção e quantificação dos analitos visando a baixa concentração dos mesmos. Os ensaios foram conduzidos utilizando HNO_3 0,5 mol L^{-1} como solvente extrator e isopropanol como solvente dispersor, onde foi preparado uma mistura com 25% de extrator e 75% de dispersor e aplicados a amostra uma fase de 1 mL.

A partir desses ensaios determinou-se a massa de amostra a ser usada na determinação dos demais parâmetros, compatível com a concentração dos analitos, uma vez que a pré-concentração dos analitos é indispensável para determinação dos limites de detecção e quantificação do método.

4.5.2 Adição de analitos nas amostras

As amostras foram pesadas em balança analítica em frascos de polipropileno (250 mL), previamente descontaminados. Logo em seguida, foram adicionadas as quantidades específicas do padrão multielementar de biodiesel B 100 (Conostan) com os analitos Na, K, Ca e Mg. Todas as amostras foram preparadas com 1 mg g^{-1} dos analitos para os ensaios de recuperação, uma vez que a exatidão e precisão do método foram avaliados mediante a adição e recuperação dos analitos em amostras comerciais de biodiesel. Os frascos foram submetidos à agitação mecânica intensa com a finalidade de homogeneização da amostra e o padrão adicionado. Todos os frascos foram identificados com data e concentração dos analitos. Para minimizar possíveis erros, o procedimento de adição de analitos foi realizado diariamente.

4.5.3 Avaliação do solvente dispersor

Os solventes dispersores avaliados foram o isopropanol e o etanol. Além disso, a proporção do dispersor em relação ao extrator foi ajustada. Onde a fase contendo a mistura do solvente extrator e dispersor foi avaliada em diferentes proporções que variaram em 65, 70, 75, 80 e 85% de dispersor em relação ao volume total da mistura.

4.5.4 Concentração do Solvente extrator

O HNO_3 foi escolhido como extrator e sua eficiência foi avaliada para recuperação dos analitos. Experimentos referentes ao estudo da concentração do mesmo foram feitos, em concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2 mol L⁻¹. Os volumes da mistura de extrator e dispersor utilizados para o procedimento de RP-DLLME variaram entre 0,5; 1,0; 1,5 e 2 mL.

4.5.5 Temperatura das amostras e uso de ultrassom

A influência da temperatura no instante da injeção da mistura de solventes dispersor e extrator nas amostras foi estudada. Foram avaliadas amostras com temperaturas de 45, 55, 65 e 75 °C. A temperatura máxima definida foi abaixo do ponto de ebulição dos dispersores selecionados (Isopropanol 82,6 °C e etanol 78,37 °C).

A influência de ultrassom na extração dos analitos também foi estudada, com o uso de um banho de ultrassom, onde 12 amostras foram submetidas simultaneamente. Os tempos pré-determinados foram 0, 5 e 10 minutos, com frequência de 37 kHz.

4.6 PROCEDIMENTO DE RP-DLLME UTILIZADO PARA DETERMINAÇÃO Na, K, Ca, Mg EM BIODIESEL.

Foram pesados 10,0 g de amostra em tubos de polipropileno com capacidade de 15 mL e levadas para aquecimento em banho-maria por cerca de 20 min até atingirem 75 °C, posteriormente foram adicionadas a elas 1,0 mL da mistura contendo os solventes dispersor e extrator. As amostras foram submetidas à agitação manual. Após, as amostras foram então submetidas à centrifugação pelo período de 15 min a 5600 g em temperatura ambiente. Após centrifugação, retirou-se (com auxílio de uma pipeta) parte da amostra para facilitar a retirada da fase sedimentada. A separação entre as fases tornou-se evidente sendo possível a extração da fase aquosa para balão volumétrico (5,0 mL) com auxílio de pipeta, onde aferiu-se com água ultra pura e adicionados 0,5% (v/v) solução de Schinkel para posterior determinação por espectrometria atômica. Uma representação do procedimento de RP-DLLME está mostrada na Figura 4.

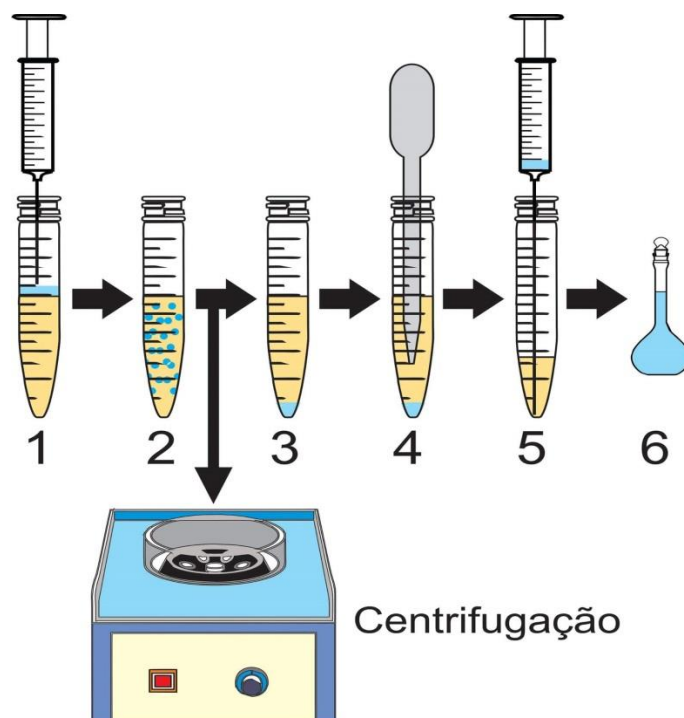


Figura 4. Procedimento RP-DLLME em amostras de biodiesel.

Etapa (1) injeção da mistura de solventes dispersor e extrator; (2) formação de solução turva imediatamente e agitação manual; (3) após centrifugação, a fase aquosa deposita-se no fundo do recipiente; (4) retirada de parte da amostra (biodiesel); (5) retirada da fase sedimentada e transferência para balão volumétrico (5 mL); (6) fase sedimentada devidamente aferida para determinação elementar.

Ensaio de recuperação foram realizados com o intuito de estimar o percentual de recuperação dos analitos nas amostras investigadas. Os cálculos referentes a esses ensaios foram efetuados a partir da equação 1.

$$\text{Recuperação em \%} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde:

C_1 é a concentração final da amostra com adição do analito,

C_2 é a concentração pré-existente na amostra antes da adição do analito,

C_3 é o valor de analito adicionado na amostra.

Testes de recuperação foram aplicados para todas as amostras estudadas e os respectivos ensaios realizados em triplicatas. A eficiência e desempenho do método foram conduzidos de forma a garantir a exatidão e precisão do mesmo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS EXTRAÇÃO EMPREGANDO RP-DLLME

5.1.1 Avaliação dos solventes dispersor e extrator

Inicialmente, para a escolha do solvente extrator, foram analisadas características necessárias aos procedimentos envolvendo a microextração, como baixa solubilidade na amostra, maior densidade que a fase amostra e capacidade de extração e pré-concentração dos íons metálicos.

O HNO_3 já foi utilizado na RP-DLLME para extração de Cd e Pb em amostras de óleos vegetais (López-García et al., 2014). Em procedimentos de extração assistida por ultrassom o uso de HNO_3 foi viabilizado, para elementos como: Cu, Fe, Ni e Zi em amostras de óleos comestíveis (ANWAR et al., 2004). Para a RP-DLLME deve-se considerar que o solvente extrator deve ser insolúvel na matriz da amostra, para que o fator de enriquecimento dos analitos na fase extratora e a recuperação sejam considerados eficientes, uma vez que a solubilidade pode interferir no fator de enriquecimento e diminuir significativamente os valores de recuperação dos analitos que podem ficar retidos na amostra (HASHEMI et al., 2010).

Em ensaios preliminares observou-se visualmente que quando aplicado HNO_3 diluído na extração, promove-se a imediata formação de fase turva na amostra, sendo considerada estável e de volume reprodutível. Outra vantagem é a possibilidade do uso de ácido diluído (0,5 e 2,0 mol L^{-1}) em todos os ensaios realizados, que resulta em baixo consumo de solventes, característica indispensável para RP-DLLME.

Como solventes dispersores foram avaliados o isopropanol e etanol. Esses solventes foram escolhidos levando em consideração que os solventes dispersores devem possuir características compatíveis com as recomendadas para o procedimento de RP-DLLME (miscíveis na amostra e no solvente extrator) (FARAJZADEH et al, 2014).

O procedimento de RP-DLLME foi desenvolvido com auxílio de pipeta automática, onde foi inserido 1,0 mL da mistura de solventes extrator e dispersor (75% dispersor (v/v) e 25% (v/v) de HNO_3 a 0,5 mol L^{-1} de extrator), conforme aplicado em metodologia desenvolvida por Lopez-Garcia et al., (2014), para a

extração de Cd e Pb por RP-DLLME em amostras de óleos comestíveis. Após injeção rápida da mistura de solventes pode ser observada a formação de uma fase turva e logo em seguida o surgimento de microgotas. Aos poucos observou-se a sedimentação ao longo da amostra, houve a formação parcial de fase sedimentada, que pode ser melhor observada depois da etapa de centrifugação.

Os solventes dispersores etanol e isopropanol foram considerados eficientes quando relacionados à dispersão em amostras de biodiesel. A solução turva na fase da amostra e a formação de microgotas foram indicativos do efeito do dispersor na amostra, o que viabilizou o uso de ambos os dispersores para os ensaios subsequentes.

Para a escolha do dispersor mais adequado para o procedimento de RP-DLLME ensaios de recuperação foram aplicados em amostras com adição de analito, conforme descrito no item 4.5.2, utilizando os dispersores etanol e isopropanol. A partir desses ensaios a melhor recuperação dos analitos foi obtida com o uso de isopropanol, ou seja, resultado mais próximo de 100% da massa de analito adicionado as amostras foram recuperados para Na, K, Ca e Mg. Os resultados correspondentes aos ensaios de recuperações para ambos os dispersores estão mostrados na Figura 5.

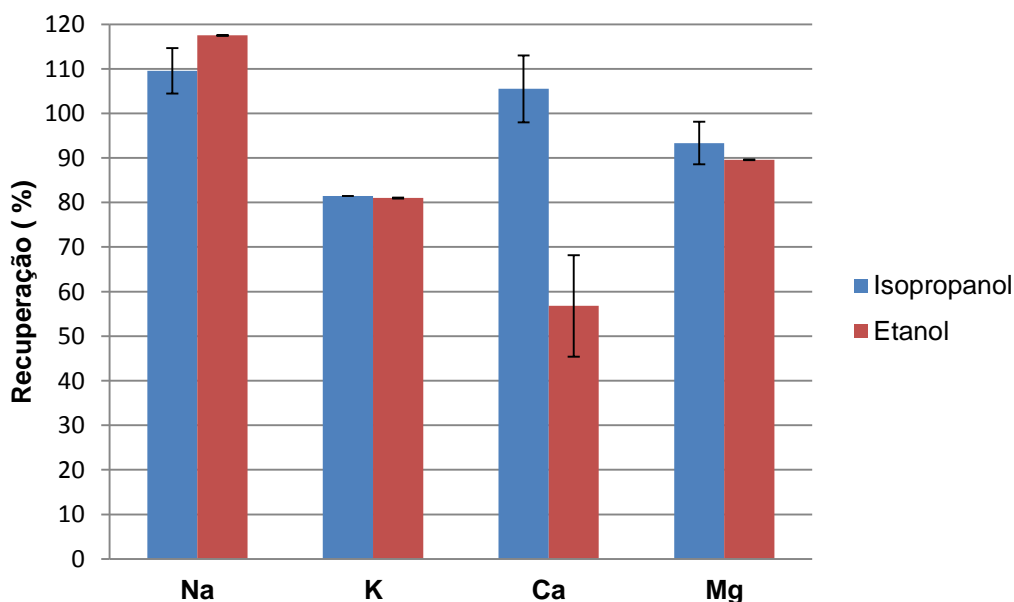


Figura 5. Efeito do uso de isopropanol e etanol como dispersores na recuperação de Na, K, Ca e Mg. Condições: massa de amostra: 10 g; mistura de solventes: 75% (v/v) de dispersor e 25% (v/v) de solução de extrator HNO_3 a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; volume da mistura de extrator e dispersor: 1,0 mL; temperatura: $75 \text{ }^\circ\text{C}$; banho de

ultrassom: 10 min/75 °C e centrifugação (15 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).

Para os elementos Na, Ca e Mg o uso de isopropanol mostrou-se mais eficiente na recuperação dos analitos. Sendo que para K o efeito dos dois dispersores na recuperação foi considerados estaticamente iguais (teste *t-student*, nível de confiança de 95%). Para Ca e Mg os valores de recuperação com o etanol foram significativamente inferiores quando comparados aos mesmos elementos com o uso de isopropanol.

Em estudos realizados por Lopez-Garcia et al., (2014) para extração de Pb e Cd de amostras de óleos comestíveis e Lopez-Garcia et al. (2015) para As solúvel em água e em óleos aplicado RP-DLLME, foi observado o isopropanol como dispersor adequado para o procedimento.

Com base nos resultados obtidos para a recuperação de ambos os dispersores, os ensaios subsequentes foram realizados com o uso de isopropanol como solvente dispersor.

5.1.2 Avaliação da massa da amostra

Nos ensaios para a avaliação da massa de amostras, foi levada em consideração a baixa concentração dos analitos em amostras de biodiesel. Amostras sem a adição de analitos foram submetidas a ensaios, para verificar a eficiência da extração em baixas concentrações com massas iguais as submetidas a ensaios de recuperação. Amostras com massas de 10, e 20,0 g também foram submetidas ao procedimento, visando a detecção e quantificação de Na, K, Ca e Mg em amostras sem a adição de analitos, uma vez que maiores massas terão maiores concentrações de analitos.

As amostras para este ensaio foram de 3,0; 5,0; 10,0 e 20,0 g, sendo as mesmas com adição de 3,0; 5,0; 10,0 e 20,0 µg de Na, K, Ca e Mg, respectivamente com padrão multielementar Conostan[®]. As amostras com e sem a adição de analitos, foram submetidas a RP-DLLME. Onde após pesadas foram aquecidas a 75 °C e logo em seguida submetidas à injeção rápida da mistura contendo o extrator (HNO₃ 0,5 mol L⁻¹ (25%, v/v)) e dispersor (isopropanol (75%, v/v)) em seguida foram submetidas a agitação e 15 min de centrifugação (5600 g).

Os ensaios de recuperação mostraram-se satisfatórios para todas as massas de amostras com adição de analitos. A quantificação dos analitos em amostras sem adição de padrão de 3,0 e 5,0 g não obtiveram analitos suficientes para serem extraídos e pré-concentrados dentro dos limites de detecção e quantificação do método proposto.

Para os ensaios de recuperação com adição de Na, K, Ca e Mg as amostras de 10,0 e 20,0 g, obtiveram valores de recuperação média, de 88 e 80%, respectivamente, onde as amostras com 10,0 g obtiveram RSD inferior a 4%, resultado considerado satisfatório quando comparado ao RSD de 18% obtidos para 20,0 g de amostra. Com base nos resultados obtidos para recuperação dos analitos as amostras de 10,0 g passam a ser usadas para todos os ensaios subsequentes.

5.1.3 Avaliação da influência do ultrassom

Em estudos recentes, o ultrassom foi utilizado como parte do preparo de amostras empregando a métodos por RP-DLLME para amostras viscosas (LOPEZ-GARCIA et al., 2014; LOPEZ-GARCIA et al., 2015).

Para a avaliação do uso de ultrassom nesse trabalho, ensaios de recuperação foram feitos com a finalidade de avaliar a influência do uso do mesmo na exatidão dos resultados apresentados pelo método proposto. As amostras de um mesmo biodiesel com adição de analitos foram pesadas e aquecidas a 75 °C e logo em seguida submetidas a injeção rápida da mistura contendo o extrator (HNO_3 0,5 mol L⁻¹ (25%, v/v)) e dispersor (isopropanol (75%, v/v)) em seguida foram submetidas a agitação. Logo em seguida foram encaminhadas a três procedimentos diferentes, todos com temperatura de 75 °C: uso do banho de ultrassom (37 kHz), por 5 min, 10 min e amostras que não foram submetidas ao banho de ultrassom, após foram encaminhadas a 15 min de centrifugação (5600 g). Os resultados estão mostrados na Figura 6 e Tabela 4.

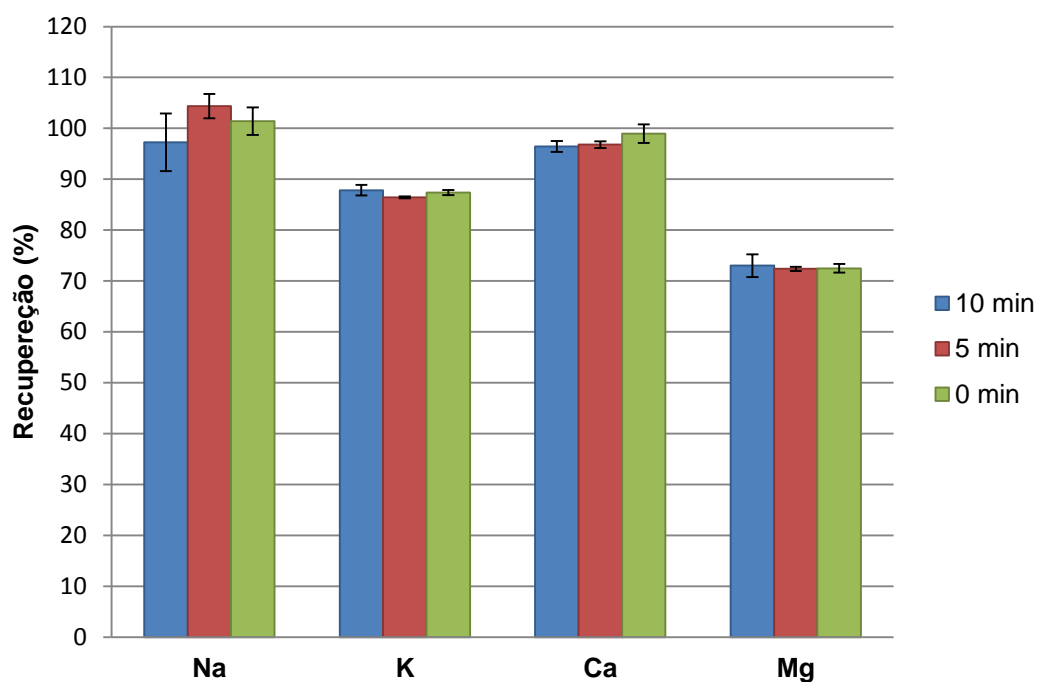


Figura 6. Efeito do uso de ultrassom na recuperação de Na, K Ca e Mg. Condições: massa de amostra: 10 g; mistura de solventes: 75% (v/v) de dispersor e 25% (v/v) de solução de extrator HNO_3 a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; volume da mistura de extrator e dispersor: 1,0 mL; temperatura: $75 \text{ }^\circ\text{C}$ e centrifugação (5, 10 e 15 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão ($n=3$).

Tabela 4. Teste Tukey (nível de confiança de 95%), avaliação do efeito do uso de ultrassom em ensaios de recuperação de Na, K, Ca, Mg.

Ultrassom (min)	Na	K	Ca	Mg
0	a	a	a	a
5	a	a	a	a
10	a	a	a	a

Como pode ser observado na Figura 6 e na Tabela 4, não há diferença significativa (teste de *Tukey* nível de confiança de 95%) entre os ensaios com e sem o uso de ultrassom para todos os analitos estudados. Os RSD's em todos os ensaios foram inferiores a 10% para todos os analitos.

Em uma revisão feita por Andruch et al. (2013), foi relatado o uso do ultrassom em procedimentos de microextração e ressaltam a influência positiva do seu uso nos resultados aplicando extração. Geralmente, o ultrassom está ligado ao uso de métodos empregando microextração assistida por ultrassom onde o solvente dispersor não é empregado e o ultrassom promoveu a função deste mediante adição

de solvente extrator. Porém, até o momento não há estudos para avaliar a influência do uso de ultrassom empregando RP-DLLME.

Castro e Capote (2007) ressaltam que extrações que envolvam transferências da fase orgânica para fase aquosa são mais favorecidas pelo uso de ultrassom, o que não pode ser observado a partir dos resultados obtidos nesse trabalho. Com base nos resultados obtidos os ensaios subsequentes foram realizados sem o uso de ultrassom.

5.1.4 Tempo de centrifugação

O tempo de centrifugação foi estudado com a finalidade de separar completamente a fase aquosa contendo os analitos da fase da orgânica, nesse sentido, a condição adequada foi determinada a partir do melhor desempenho obtido em ensaios de recuperação.

Amostras de biodiesel com adição de analitos foram pesadas e aquecidas a 75 °C e logo em seguida submetidas a injeção rápida da mistura contendo o extrator (HNO_3 0,5 mol L⁻¹ (25%, v/v)) e dispersor (isopropanol (75%, v/v)) em seguida foram submetidas a agitação. Nos ensaios anteriores, usou-se 15 min de centrifugação. Para determinação do tempo adequado nesse estudo os mesmos foram pré-determinados em 5, 10 e 15 min a 5600 g. Os dados de recuperação dos ensaios são mostrados na Figura 7 e Tabela 5.

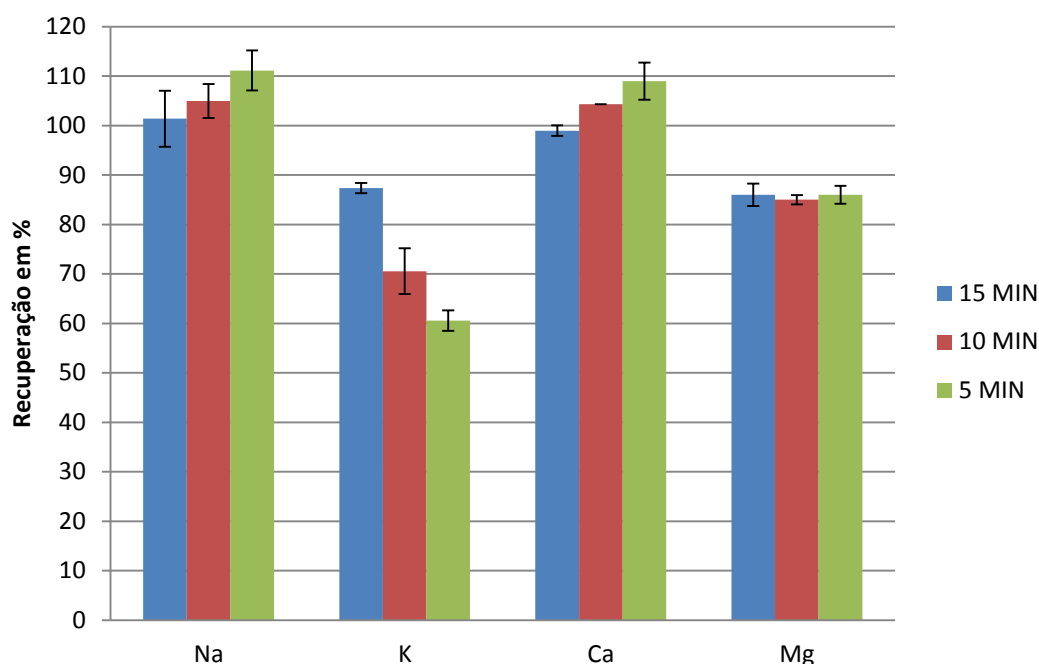


Figura 7. Efeito do uso de diferentes tempos de centrifugação na recuperação de Na, K, Ca e Mg. Condições: massa de amostra: 10 g; mistura de solventes: 75% (v/v) de dispersor e 25% (v/v) de solução de extrator HNO₃ a 0,5 mol L⁻¹; volume da mistura de extrator e dispersor: 1,0 mL; temperatura: 75 °C e centrifugação (0, 5 e 10 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).

Tabela 5. Teste Tukey (nível de confiança de 95%), avaliação do efeito de diferentes tempos de centrifugação na recuperação de Na, K, Ca e Mg.

Centrifugação (min)	Na	K	Ca	Mg
5	a	a	a	a
10	a	b	b	a
15	a	c	b	a

Potássio e cálcio apresentaram diferenças estatísticas entre as médias (teste de *Tukey* com nível de confiança de 95%) dos tratamentos e as melhores recuperações foram alcançadas com 15 minutos de centrifugação. O sódio e o magnésio por sua vez não apresentaram diferenças estatísticas entre as médias (teste de *Tukey* com nível de confiança de 95%) para os diferentes tempos de centrifugação. Para todos os analitos os resultados de recuperação foram superiores quando usados maior tempo de centrifugação viabilizando a escolha de 15 min como tempo ideal para separação da fase sedimentada.

Estudos apontam tempos e velocidades diferentes de centrifugação quando aplicados a métodos com o uso de RP-DLLME, que podem variar de acordo com a

amostra, analito e solventes utilizados na extração. Com base nos resultados obtidos para a recuperação dos analitos em diferentes tempos, o uso de 15 min tornou-se indispensável uma vez que as recuperações conferiram aos ensaios maior exatidão.

5.1.5 Proporção de isopropanol na fase extratora

O volume do solvente dispersor no processo de microextração é extremamente importante, uma vez que a falta ou excesso do mesmo pode acarretar em extração incompleta dos analitos (MACIEL, 2013). A proporção ideal de solventes foi avaliada objetivando a maior recuperação dos analitos.

Amostras de biodiesel com adição de analitos Na, K, Ca e Mg foram pesadas e aquecidas a 75 °C e logo em seguida submetidas a injeção rápida da mistura contendo o extrator (HNO_3 0,5 mol L⁻¹ (25%, v/v)) e dispersor (isopropanol (60, 65, 70, 75, 80, 85%, v/v)) em seguida foram submetidas a agitação e em seguida 15 min de centrifugação a 5600 g. Na Figura 8 e Tabela 6 estão mostrados os resultados obtidos para diferentes proporções de isopropanol como dispersor nos ensaios de RP-DLLME.

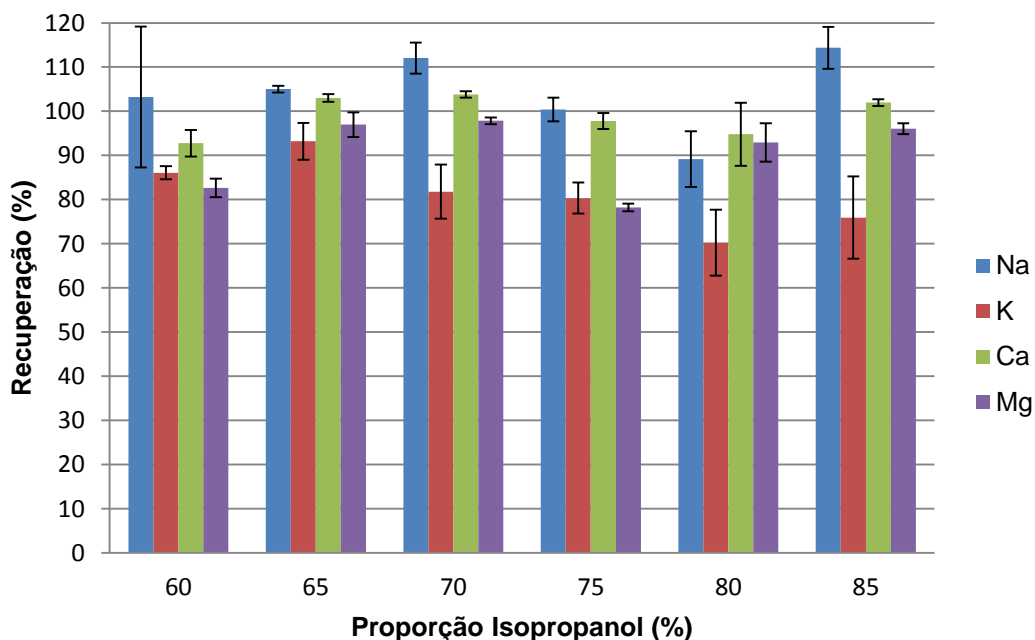


Figura 8. Efeito da proporção isopropanol na recuperação de Na, K, Ca e Mg.

Condições: massa de amostra: 10 g; proporção do isopropanol: de 60% á 85% em relação à solução de solvente extrator HNO_3 a 0,5 mol L⁻¹; volume da mistura de extrator e dispersor: 1,0 mL; temperatura: 75 °C e centrifugação (15 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).

Tabela 6. Teste Tukey (nível de confiança de 95%), avaliação do efeito de diferentes proporções de isopropanol na recuperação de Na, K, Ca e Mg.

Isopropanol (%)	Na	K	Ca	Mg
60	a	a	a	a
65	a	b	b	b
70	ab	abc	b	b
75	a	c	ac	a
80	a	c	ac	b
85	ab	ac	b	b

Os ensaios com 65 e 70% de isopropanol não foram considerados estatisticamente diferentes para todos os analitos simultaneamente (teste *Tukey* nível de confiança de 95%), enquanto os demais ensaios mostraram-se estatisticamente diferentes entre si para pelo menos um dos analitos. Porém as melhores recuperações especialmente para Na e K justificam o uso de 65% de isopropanol em relação a solução de HNO₃.

Para Sódio as recuperações foram consideradas estatisticamente iguais (teste de *Tukey* com nível de confiança de 95%) para todos os ensaios avaliados. Porém, para Na o RSD foi considerado o mais elevado quando comparado ao K, Ca e Mg, variando de 0,7 a 16%.

Observou-se que quanto maior a fase de dispersor menor torna-se a recuperação para K, uma vez que diminui o volume da solução de extrator proporcionalmente. Para o Potássio a melhor recuperação pode ser observada com 65% de dispersor. Com base nos resultados apresentados, pode-se comprovar que o uso de 65% de isopropanol na mistura de solventes dispersor e extrator foi considerado ideal para ao analito Na, K, Ca e Mg, viabilizando sua aplicação a todos os ensaios subsequentes.

5.1.6 Concentração de HNO₃ na fase extratora

A influência da concentração do HNO₃ foi avaliada, levando em consideração que a extração ocorre necessariamente com volume e concentração adequados. O volume da fase extratora foi fixado em 35% (v/v) mediante ensaios realizados anteriormente com a proporção da fase dispersora. Assim, foram realizados ensaios de recuperação onde foi identificada a melhor concentração de

solução de HNO_3 para que ocorra a extração eficiente dos analitos da fase da amostra.

Amostras de biodiesel com adição de analitos Na, K, Ca e Mg foram pesadas e aquecidas a $75\text{ }^\circ\text{C}$ e logo em seguida submetidas a injeção rápida da mistura contendo o extrator (HNO_3 a $0,5, 1,0, 1,5$ e $2,0\text{ mol L}^{-1}$ (35%, v/v)) e dispersor (isopropanol (65%, v/v)) em seguida foram submetidas a agitação e em seguida 15 min de centrifugação a 5600 g . O procedimento de RP-DLLME foi avaliado em diferentes concentrações de HNO_3 e comparados ao ensaio com uso apenas de água ultrapura como solvente extrator. Os dados referentes a esses ensaios estão mostrados na Figura 9 e Tabela 7.

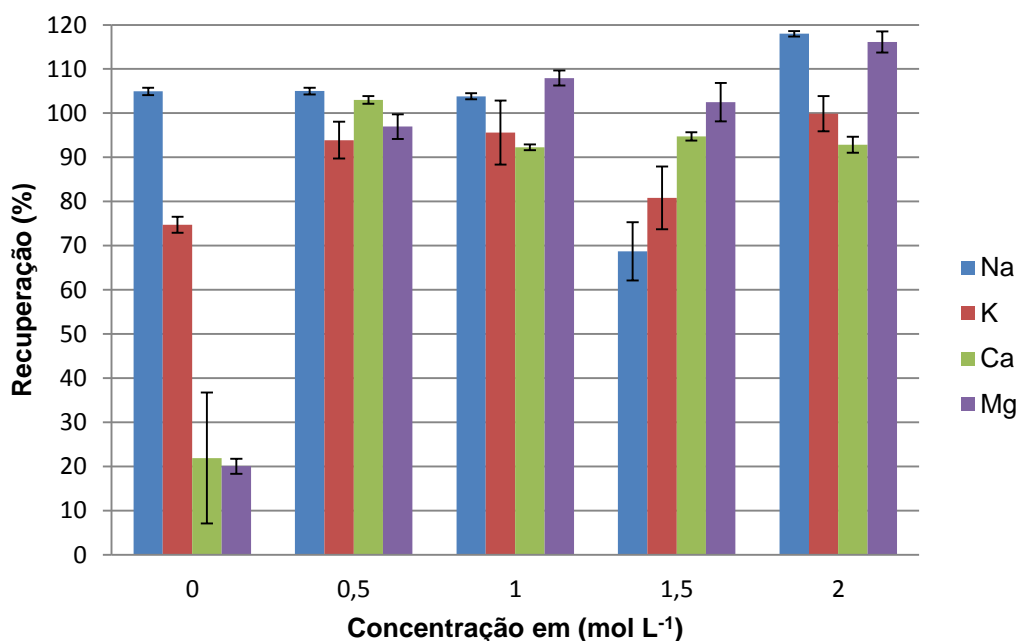


Figura 9. Ensaio de recuperação para avaliação da concentração de HNO_3 . Condições: massa de amostra: 10 g; dispersor: 65% de isopropanol; extrator: variação de concentração de HNO_3 de 0 a $2,0\text{ mol L}^{-1}$; volume da mistura de extrator e dispersor: 1,0 mL ; temperatura da amostra: $75\text{ }^\circ\text{C}$; centrifugação: (15 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão ($n=3$).

Tabela 7. Teste Tukey (nível de confiança de 95%), avaliação do efeito de diferentes concentrações de HNO₃ na recuperação de Na, K, Ca e Mg.

Concentração HNO ₃ (mol L ⁻¹)	Na	K	Ca	Mg
0	a	a	a	a
0,5	a	b	b	b
1	a	bc	c	c
1,5	b	c	c	bc
2	c	b	c	d

Os testes de comparação de médias com base nas recuperações mostraram que houve diferença estatística entre os tratamentos para os analitos nos diferentes ensaios (teste de *Tukey* com nível de confiança de 95%). Sendo que os melhores resultados de recuperação para Na, K, Ca e Mg foram obtidos a partir dos ensaios realizados com as concentrações de 0,5 e 1,0 mol L⁻¹. Esses ensaios entre si não apresentaram diferença estatística de médias quando comparados para Na, K e Mg (teste de *Tukey* com nível de confiança de 95%), sendo que a melhor recuperação para Ca se manteve nos ensaios de 0,5 mol L⁻¹.

No procedimento de extração realizado apenas com água como extrator, apenas para Na a recuperação foi efetiva de 105% com RSD de 0,8%. Entretanto, os outros analitos K, Ca e Mg obtiveram baixas recuperações na ausência do HNO₃.

O ensaio com 0,5 mol L⁻¹ mostrou-se mais eficiente na recuperação dos analitos Na, Ca e Mg tendo seus valores de recuperação de 105, 103 e 97%, respectivamente. O RSD encontrado para Na, Ca e Mg foram 0,7; 0,9; 2,8, respectivamente.

O uso da solução contendo concentração de 0,5 mol L⁻¹ pode ser selecionado, uma vez que os ensaios com concentração de 0,5 e 1,0 mol L⁻¹ não apresentaram diferença estatística (teste *t-student* com nível de confiança de 95%) para os metais Na, K e Mg. Já o K obteve maior recuperação com extração realizada com 0,5 mol L⁻¹, associados aos benefícios do uso de soluções diluídas no preparo de amostras. Para todos os ensaios posteriores a solução extratora foi fixada a 0,5 mol L⁻¹.

5.1.7 Volume da fase dispersora/extratora

A influência do volume total da mistura de solventes de dispersor e extrator na extração dos analitos foi avaliada com o intuito de promover ao processo de preparo de amostra maior exatidão na recuperação e garantir que os solventes

necessários para extração estejam em quantidades apropriadas, favorecendo uma extração considerada eficiente e sem uso excessivo de reagentes.

Os ensaios foram desenvolvidos com diferentes volumes da mistura dos solventes dispersor e extrator, onde os mesmos foram conduzidos com as mesmas condições. Amostras de biodiesel com adição de analitos Na, K, Ca e Mg foram pesadas e aquecidas a 75 °C e logo em seguida submetidas a injeção rápida da mistura contendo o extrator (HNO_3 0,5 mol L⁻¹ (35%, v/v)) e dispersor (isopropanol (65%, v/v)). A mistura contendo o extrator e dispersor foram injetados nas amostras e avaliado os volumes de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mL. As mesmas foram submetidas a agitação e em seguida 15 min de centrifugação a 5600 g. Os dados obtidos através desses ensaios estão mostrados na Figura 10 e Tabela 8.

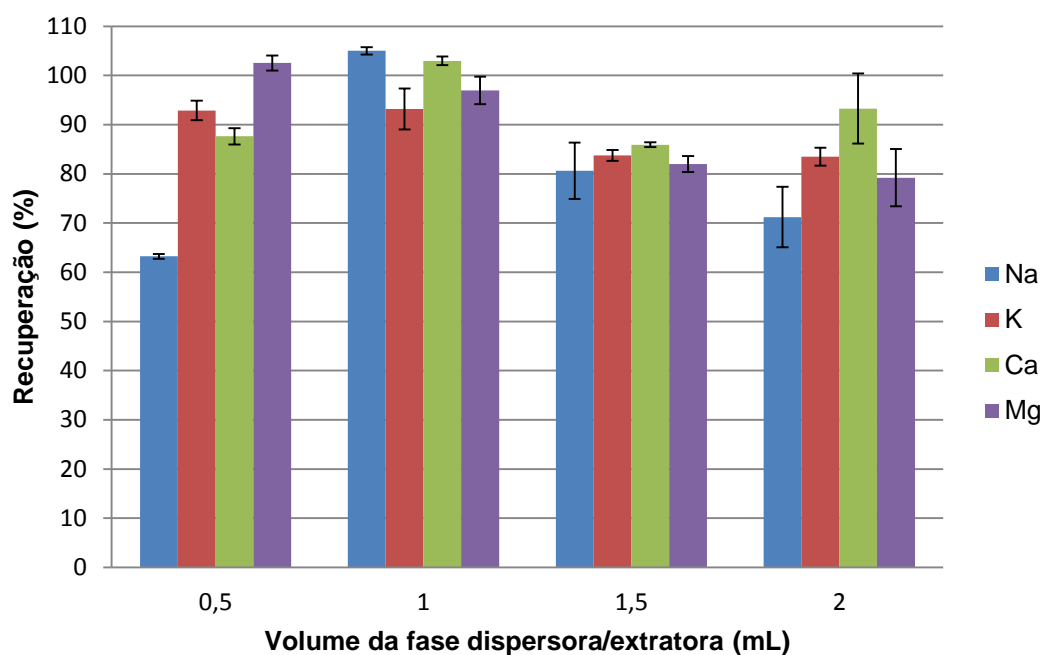


Figura 10. Ensaio de recuperação para avaliação do volume mistura de solventes dispersor e extrator. Condições: massa de amostra: 10 g; dispersor: 65% de isopropanol; extrator: HNO_3 a 0,5 mol L⁻¹; volume da mistura de extrator e dispersor: de 0,5 a 2,0 mL ; temperatura da amostra: 75 °C; centrifugação: (15 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).

Tabela 8. Teste Tukey (nível de confiança de 95%), avaliação do efeito de diferentes volumes da mistura de solventes na recuperação de Na, K, Ca e Mg.

Volume da fase extratora (mL)	Na	K	Ca	Mg
0,5	a	a	a	a
1	b	a	b	a
1,5	c	b	a	b
2	c	b	b	b

Os melhores resultados de recuperação foram obtidos a partir do uso 0,5 e 1,0 mL de mistura de solventes extrator e dispersor. Para os elementos K e Mg as médias não foram consideradas estatisticamente diferentes (teste de *Tukey* com nível de confiança de 95%). Porém, para Na e Ca os valores de recuperação tiveram suas médias consideradas estatisticamente diferentes (teste de *Tukey* com nível de confiança de 95%), evidenciando uma maior recuperação para os ensaios que utilizaram de 1,0 mL de fase dispersora/extratora. O sódio teve sua recuperação muito reduzida com fase extratora com menor volume. A partir disso, o volume de 1,0 mL foi fixado como volume adequado para ensaios posteriores.

5.1.8 Temperatura

Por fim, foi avaliada a influência do controle de temperatura das amostras nos ensaios de recuperação. A literatura apresenta estudos onde o procedimento de RP-DLLME foi proposto sem o uso de controle de temperaturas (DAIRI et al., 2015; LIU et al., 2013; GODOY-CABALLERO et al., 2013). Entretanto alguns métodos de RP-DLLME encontrados apresentam o uso de aquecimento das amostras, citando o uso de controle de temperatura como indispensável para o desenvolvimento do método nos procedimentos de RP-DLLME em amostras viscosas (LÓPEZ-GARCIA et al., 2014; LÓPEZ-GARCIA et al., 2015).

No presente estudo, em ensaios preliminares não mostrados, por meio de observação visual, foi possível perceber a falta de dispersão da mistura de solventes em amostras com temperaturas inferiores a 45 °C. Neste caso, após a injeção da fase dispersora/extratora, a mesma permaneceu sob a amostra e sedimentando lentamente após alguns segundos e em gotas grandes não ocorrendo a dispersão imediata. Consequentemente, não resultando em formação de solução turva e nem na presença de microgotas, característica importante para que ocorra a extração dos analitos (REZAEI et al., 2010; HASHEMI et al., 2011). Observou-se também que

com a temperatura de 80 °C, no entanto, houve a evaporação de parte do dispersor, logo quando injetado, o que inviabilizou o uso dessa temperatura para os testes subsequentes. Provavelmente, isso ocorreu devido ao ponto de ebulição do isopropanol ser de 82,6 °C.

Um único trabalho foi encontrado na literatura com a aplicação de RP-DLLME para determinação de metais, em amostras de óleos comestíveis. A temperatura proposta para estudo realizado por Lopez-Garcia e colaboradores (2014) foi de 80 °C, usando isopropanol como dispersor.

Amostras de biodiesel com adição de analitos Na, K, Ca e Mg foram pesadas e aquecidas a 45, 55, 65 e 75 °C e logo em seguida submetidas a injeção rápida de 1 mL da mistura contendo o extrator (HNO_3 0,5 mol L⁻¹ (35%, v/v)) e dispersor (isopropanol (65%, v/v)) em seguida foram submetidas a agitação e em seguida 15 min de centrifugação a 5600 g. Na Figura 11 e Tabela 9, estão mostrados os resultados obtidos para ensaios realizados com diferentes temperaturas.

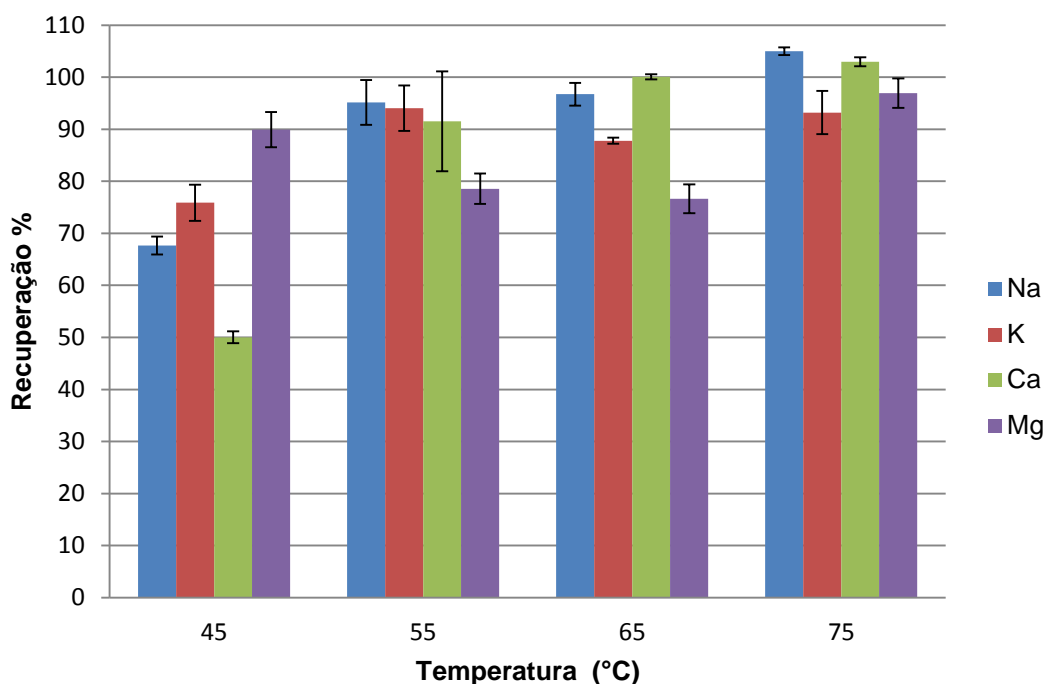


Figura 11. Ensaios de recuperação para avaliação do uso de diferentes temperaturas das amostras. Condições: massa de amostra: 10 g; dispersor: 65% de isopropanol; extrator: HNO_3 a 0,5 mol L⁻¹; volume da mistura de extrator e dispersor: 1,0 mL ; temperatura da amostra: de 45 a 75 °C; centrifugação: (15 min a 5600 g). As barras de erros representam o desvio padrão (n=3).

Tabela 9. Teste Tukey (nível de confiança de 95%), avaliação do efeito de diferentes temperaturas da amostra na recuperação de Na, K, Ca e Mg.

Temperatura (°C)	Na	K	Ca	Mg
45	a	a	a	a
55	b	b	b	b
65	b	b	b	b
75	c	b	b	c

Os tratamentos com 55, 65 e 75 °C apresentaram recuperações consideradas satisfatórias, enquanto os ensaios realizados com a temperatura de 45 °C apresentou baixas recuperações para Na, K e Ca.

Para Potássio e Cálcio, os ensaios com 55, 65 e 75 °C não se mostraram estatisticamente diferentes, enquanto que para Na e Mg o ensaio com melhor recuperação foi o que utilizou temperatura de 75 °C. Para ensaios posteriores a temperatura das amostras foi fixada em 75 °C, uma vez que todos os analitos obtiveram maiores recuperações e os RSD inferiores.

5.2 CONDIÇÕES PARA APLICAÇÃO DE RP-DLLME EM BIODIESEL

Mediante todos os ensaios desenvolvidos ao longo dessa pesquisa, ficaram definidas as condições consideradas ideais para a aplicação do procedimento de RP-DLLME em amostras de biodiesel para posterior determinação de Na, K, Ca e Mg. Dentre os parâmetros avaliados, as melhores condições estão mostradas na Tabela 10.

Tabela 10. Condições ajustadas para aplicação de metodologia de RP-DLLME para determinação Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel.

Parâmetros	Melhores condições
Solvente dispersor	Isopropanol, 650 µL
Solvente extrator	HNO ₃ 0, 5 mol L ⁻¹ , 350 µL
Centrifugação	15 min a 5600 g
Temperatura	75 °C
Massa de amostra	10 g

A partir dos ajustes das condições do método, o mesmo pode ser caracterizado e aplicado em amostras de biodiesel comercial para quantificação dos analitos. A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação aplicados em diferentes faixas de concentração dos analitos e diferentes amostras.

5.2.1 Curva de calibração e faixa linear para determinação de Na, K, Ca e Mg por F AAS

Para avaliar a faixa de calibração analítica e faixa linear foi feita a calibração externa do equipamento com soluções de referência aquosas multielementares em diferentes concentrações. As soluções foram preparadas com água ultrapura com HNO₃ 0,5% (v/v) com solução de Schinkel 0,5% (v/v). Os valores de faixa linear foram observados a partir da relação entre o sinal de absorbância obtido em altura e a concentração dos analitos na curva de calibração e representada pelo coeficiente de correlação linear (R^2) (INMETRO, 2011; GONZÁLES e HERRADOR, 2007). Os dados de faixa linear, coeficiente de correlação linear (R^2) e equação da reta estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Coeficiente de correlação linear, equação da reta e faixa linear da curva de calibração externa para Na, K, Ca e Mg.

Analito	R^2*	Equação da reta	Faixa linear, mg L⁻¹
Na	0,994	$y = 0,3123x + 0,0321$	0,1 - 2,0
K	0,998	$y = 0,5381x + 0,0248$	0,1 - 2,0
Ca	0,996	$y = 0,0157x - 0,0002$	0,1 - 2,0
Mg	0,999	$y = 0,422x - 0,0046$	0,1 - 2,0

* R^2 : coeficiente de correlação linear.

Para Na, K, Ca e Mg observou-se faixa linear entre as concentrações de 0,1 a 2,0 mg L⁻¹. Todos os analitos obtiveram um coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,99, os quais podem ser considerados lineares (GREEN, 1996).

5.2.2 Limites de detecção e quantificação

Os LD's e o LQ's instrumentais e do método proposto foram calculados conforme recomendado pelo INMETRO, (2011). Os LD's e LQ's instrumentais foram determinados a partir de medidas do branco das amostras (n=10) para todos os

analitos. O branco foi preparado a partir de 1 mL de mistura dos solventes extrator e dispersor diluídos em balão volumétrico de 5 mL com água ultrapura e adição de solução de Schinkel 0,5% (v/v).

Para a determinação dos LD's e do LQ's do método foram levados em consideração aferição, massa da amostra e diluição durante o preparo das amostras. Os LD's e o LQ's do método proposto estão mostrados em mg kg^{-1} . Na Tabela 12 estão listados os valores referentes aos LD's e LQ's instrumental e do método.

Tabela 12. Parâmetros para determinação de Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel por espectrometria atômica com o emprego de RP-DLLME.

Analito	LD ¹ $\mu\text{g L}^{-1}$	LQ ¹ $\mu\text{g L}^{-1}$	LD ² mg kg^{-1}	LQ ² mg kg^{-1}
Na	0,02	0,07	0,01	0,04
K	0,03	0,04	0,01	0,02
Ca	0,03	0,09	0,02	0,05
Mg	0,08	0,16	0,04	0,08

LD¹ e LQ¹: Limite de detecção e quantificação instrumental; LD² e LQ²: Limite de detecção e quantificação do método desenvolvido.

Os valores correspondentes aos LD's e ao LQ's foram considerados inferiores aos limites máximos estipulados pela legislação brasileira vigente para amostras de biodiesel. Os limites máximos para a soma de Na e K são de 5 mg kg^{-1} e a soma de Ca e Mg também não podem ultrapassar 5 mg kg^{-1} .

A metodologia indicada pela ABNT NBR 15556 para determinação de Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel, sugere a detecção de Na, K, Ca e Mg em concentrações iguais ou superiores a $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$; $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$; $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente.

Os LD' e LQ's do método para todos os analitos encontrados pelo método de RP-DLLME são inferiores aos limites da norma da ABNT NBR 15556, o que viabiliza a aplicação do método proposto nesse estudo.

5.2.3 Estudo da exatidão e precisão

A exatidão e precisão do método para determinação de Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel, foram determinadas a partir de ensaios de recuperação e os

seus respectivos RSD. Os ensaios (n=3) foram realizados com adição de analitos com massa de 10,0 µg e 50,0 µg com padrão multielementar Conostan®. Os resultados obtidos para esse estudo estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13. Ensaio de recuperação em concentrações distintas. Adição de massa dos analitos 10 µg e 50 µg para Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel misto sebo/soja (n=3).

Adição µg	Na		K		Ca		Mg	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
10	105	0,7	94	4,2	103	0,9	97	2,8
50	99	0,8	108	5,1	107	3,2	106	1,0

R: Recuperação; RSD: Desvio relativo padrão.

Para os ensaios com adição de 10,0 µg do padrão contendo os analitos, as recuperações observadas ficaram entre 94 e 105 %. Já para a adição de 50,0 µg as recuperações se mantiveram entre 99 e 108%. Cabe ressaltar que o maior RSD obtidos foi para o K, sendo de 5,1% e o menor para Na de 0,7%.

Tanto os valores de recuperação quanto os valores de RSD foram considerados adequados, levando em consideração a concentração dos analitos na amostra (aproximadamente 1,0 µg g⁻¹), a recuperação manteve-se entre 80 e 110% e RSD máximo foi inferior a 11% conforme recomendado por González e Herrador (2007). Os ensaios de recuperação para Na, K, Ca e Mg com as condições ajustadas mantiveram-se dentro dos valores recomendados pelos autores citados levando em consideração valores de recuperação e RSD, o que ressalta a exatidão e precisão do método.

5.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE BIODIESEL RECUPERAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS

O método proposto foi aplicado a amostras de biodiesel de diferentes plantas produtoras e sintetizados a partir diferentes matérias-primas com a finalidade de verificar a aplicabilidade do método proposto a possíveis variações na matriz da amostra.

As amostras foram escolhidas de acordo matérias-primas usadas na produção dos mesmos, conforme relatório da ANP (DEZEMBRO, 2015), onde estão

entre ao mais produzidos: soja, sebo bovino, sebo/soja (1:1) e algodão. Para os ensaios de recuperação todas as amostras foram submetidas à adição de 10 µg de cada analito. Além disso, o método desenvolvido foi aplicado a diferentes amostras sem a adição de analitos para determinação e quantificação de Na, K, Ca e Mg. Os resultados de ensaios de recuperação e as concentrações de Na, K, Ca e Mg nas amostras sem adição de analitos estão mostrados na Tabela 14.

Tabela 14. Ensaios de recuperação e quantificação de Na, K, Ca e Mg em amostras de biodiesel, aplicando metodologia otimizada empregando RP-DLLME por F AAS (n=3).

Recuperação								
Amostra	Na		K		Ca		Mg	
	R (%) ^b	RSD	R (%) ^b	RSD	R (%) ^b	RSD	R (%) ^b	RSD
Soja 1	103	3,2	101	9,4	110	2,3	98	3,2
Soja 2	108	2,4	101	9,0	110	4,6	95	2,8
Sebo/soja 1 ^a	105	0,7	94	4,2	103	0,9	97	2,8
Sebo/soja 2 ^a	108	2,4	93	4,4	105	7,9	100	2,5
Algodão	98	0,1	104	3,3	102	3,5	99	3,9
Quantificação								
Amostra	Na		K		Ca		Mg	
	mg k ⁻¹	SD	mg k ⁻¹	SD	mg k ⁻¹	SD	mg k ⁻¹	SD
Soja 1	0,410	± 0,02	<LD	-	0,052	± 0,00	0,056 ^c	± 0,00
Soja 2	0,258	± 0,00	<LD	-	0,034 ^c	± 0,00	<LD	-
Sebo/soja 1 ^a	0,289	± 0,01	<LD	-	0,037 ^c	± 0,00	<LD	-
Sebo/soja 2 ^a	0,034 ^c	± 0,00	0,02	± 0,00	0,024 ^c	± 0,00	0,089	± 0,00
Algodão	0,623	± 0,03	<LD	-	0,040 ^c	± 0,00	<LD	-
LD método	0,01		0,01		0,02		0,04	
LQ método	0,04		0,02		0,05		0,08	

a: Amostras com matéria-prima composta por 50% sebo bovino e 50% óleo de soja;

b: Recuperação.

c: Analitos abaixo do LQ do método.

As recuperações para todos os analitos mantiveram-se entre 93 e 110% e os RSD entre 0,1 e 9,4%. Os maiores valores de RSD foram observados para K, que variaram de 3,3 e 9,4%.

A detecção de Na foi possível em todas as amostras analisadas, enquanto que a quantificação não foi obtida apenas para a amostra de sebo/soja 2. O analito frequentemente encontrado nas amostras foi o Na o que reafirma a rota de transesterificação com uso do catalizador hidróxido de sódio como indicado pelos fabricantes de todas as amostras. Potássio por sua vez não foi quantificado em nenhuma das amostras reafirmando que a presença desse metal está vinculada ao

uso de hidróxido de potássio na rota de transesterificação, o que não é o caso das amostras analisadas.

O cálcio pode ser detectado em todas as amostras e quantificado apenas na amostra soja 1. O magnésio por sua vez, foi detectado nas amostras soja 1 e sebo/soja 2 sendo quantificado apenas na segunda amostra.

Para todas as amostras analisadas constatou-se que os analitos estudados estão abaixo dos limites máximos estipulados pela legislação brasileira que é de 5 mg kg⁻¹ para a soma de Na e K e de 5 mg kg⁻¹ para a soma de Ca e Mg em amostras de biodiesel (ANP nº14/2012).

Como os elementos Na, K, Ca e Mg estão em baixas concentrações nas amostras de biodiesel analisadas, reafirma-se a necessidade do uso de metodologia que empregue etapa de pré-concentração dos analitos, tornando possível a determinação dos analitos detectáveis por F AAS, dentro da faixa linear e com calibração externa.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo um novo método para determinação de Na, K, Ca e Mg foi desenvolvido com a finalidade de simplificar a etapa de preparo de amostras usando RP-DLLME. Neste caso, foi possível a extração e pré-concentração simultânea dos analitos. Além disso, com o procedimento RP-DLLME proposto foi possível promover agilidade nas análises de rotina exigidas pela legislação e realizadas em amostras de biodiesel para determinação desses elementos por F AAS.

Para o procedimento de preparo de amostras proposto, uma mistura de solventes isopropanol (dispensor, 650 μL) e HNO_3 0,5 mol L^{-1} (extrator, 350 μL) foi injetada na amostra (1,0 g) pré-aquecida a 75 °C com o auxílio de um pipeta automática. Após centrifugação (15 min a 5600 g), a fase da amostra foi então retirada parcialmente com auxílio de pipeta e transferida a fase aquosa para balão volumétrico, para posterior determinação elementar por FAAS.

O procedimento de RP-DLLME proposto nesse estudo mostrou-se rápido e de fácil execução, quando comparado a outras técnicas utilizadas para preparo de amostras de biodiesel, as quais geralmente empregam etapas de decomposição morosas com ácidos oxidantes concentrados em grandes volumes, uso de equipamentos com custo elevado (digestão por via úmida assistida por micro-ondas), procedimentos de diluição com solventes (xileno e/ou querosene) e preparo de soluções de referência para calibração com custo elevado (ABNT NBR 15556).

Pode-se destacar como principais vantagens do método proposto as seguintes características: tempo reduzido na etapa de preparo de amostras, simplicidade na execução e consumo reduzido de solventes, característica desejável para o preparo de amostras e de acordo com os princípios da química verde.

Na etapa de determinação dos analitos por F AAS, foi possível a calibração externa com soluções de referências aquosas mistas, suprimindo a necessidade de ajustes de viscosidade, do uso de solventes como xileno e querosene e de padrões multielementares organometálicos, o que aumenta o custo da análise.

Quanto às características analíticas do método, ainda pode-se destacar os valores satisfatórios para LD's e LQ's, exatidão (94 a 108%) e precisão (melhor que 5,1%), além de fator de enriquecimento dos analitos superior a 15. Dessa forma, os aspectos relacionados acima comprovam a viabilidade de aplicação do método

proposto para análises de rotina para amostras de biodiesel de diferentes matérias-primas para determinação de Na, K, Ca e Mg por FAAS.

7 REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. ANP. **Resolução ANP nº 14 de 11.05.2012- DOU 18.05.2012**. Disponível em < [http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0)>, acesso em 18 de setembro de 2015.

_____. ANP. **Boletim mensal do biodiesel**. Dezembro de 2015. Disponível em < <http://www.anp.gov.br/>>, acesso em 07 de fevereiro de 2016.

AL-SAIDI, H. M.; EMARA, A. A. A. **The recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of inorganic analytes**. Journal of Saudi Chemical Society, 18, 745-761. 2014.

AMAI, R. S.; DONATI, G. L.; SCHIAV, D.; NÓBREGA, J. A. **A simple dilute-and-shoot procedure for Si determination in diesel and biodiesel by microwave-induced plasma optical emission spectrometry**. Microchemical Journal, 106, 318-322. 2014.

ANSARI, R.; KAZI, T. G.; JAMALI, M. K.; ARAIN, M. B.; WAGAN, M. D.; JALBANI, N.; AFRIDI, H. I.; SHAH, A. Q. **Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique**. 115, 318-323. 2009.

ANWAR, F.; KAZI, T. G.; SALEEM, R.; BHANGER, M. I. **Rapid determination of some trace metals in several oils and fats**. Grasas y Aceites, 55. 2004.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE BIODIESEL DO BRASIL. APROBIO. **Impactos socioeconômicos da indústria de biodiesel no Brasil**. São Paulo, setembro de 2012. Disponível em: < <http://www.aprobio.com.br/Aprobio-FIPERelatorioFinalsetembro2012.pdf>>, acesso em 03 de setembro de 2015.

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 ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)**. Rio de Janeiro, 2008.

_____. **ABNT NBR 15554: Produtos Derivados de Óleos e Gorduras – Ésteres Metílicos/Étilicos de Ácidos Graxos - Determinação do Teor de Sódio por Espectrometria de Absorção Atômica**. Rio de Janeiro, 2008.

_____. **ABNT NBR 15555: Produtos Derivados de Óleos e Gorduras - Ésteres Metílicos/Étilicos de Ácidos Graxos - Determinação do Teor de Potássio por Espectrometria de Absorção Atômica**. Rio de Janeiro, 2008.

_____. **ABNT NBR 15556: Produtos Derivados de Óleos e Gorduras - Ésteres Metílicos/Etílicos de Ácidos Graxos - Determinação do Teor de Sódio, Potássio, Magnésio e Cálcio por Espectrometria de Absorção Atômica.** Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL. **Lei nº 11.097, de janeiro de 2005.** Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>, acesso em 20 de setembro de 2014.

_____. **Medida provisória nº 647, de 28 de maio de 2014.** Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2014/Mpv/mpv647.htm>, acesso em 20 de setembro de 2012.

BOZBAS, K. **Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12, 542–552. 2008.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G. **Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas.** *Química Nova*, 34, 1604-1617. 2011.

CASTRO, M. D. L. e CAPOTE, F. P. **Analytical applications of ultrasound. Techniques and instrumentation in analytical chemistry.** Elsevier, 26. 2007.

CLASEN, C. D.; LISBOA, M. T.; PINTO, A. M. T. P.; RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A. **Avaliação de métodos de solubilização para determinação de metais em glicerina proveniente da produção de biodiesel por técnicas de espectrometria atômica.** *Química Nova*, 38, 74-78. 2015.

CHENG, J.; ZHOU, Y.; ZUO, H.; DAI, G.; GUO, X. **Application of dispersive liquid–liquid microextraction and reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of two fungicides in environmental water samples.** *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 90, 845-855. 2010.

DADFARNIA, S.; SHABANI, A. M. H. **Recent development in liquid phase microextraction for determination of tracelevel concentration of metals - A review.** *Analytica Chimica Acta*, 658, 107-119. 2010.

DAIRI, S.; GALEANO-DIAZ, T.; ACEDO-VALENZUELA, M. I.; GODOY-CABALLERO, M. P. **Monitoring oxidative stability and phenolic compounds composition of myrtle-enriched extra virgin olive during heating treatment by flame, oven and microwave using reversed phase dispersive liquid–liquid microextraction (RP-DLLME)-HPLC-DAD-FLD method.** *Industrial Crops and Products*, 65, 303–314. 2015.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol.** *Energy Conversion and Management*, 43, 2349-2356. 2002.

DEMIRBAS, A. **Recent developments in biodiesel fuels.** International Journal of Green Energy, 4, 15–26. 2007.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods.** Progress in Energy and Combustion Science, 31, 466-487. 2005.

EBDON, L.; EVANS, E. H. **An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry.** Wiley. 1998.

EDLUND, M.; VISSER, H.; HEITLAND, P. **Analysis of biodiesel by argon–oxygen mixedgas inductively coupled plasma optical emission spectrometry.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 17, 232–235. 2002.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **EN 14108: Fat and Oil Derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME), Determination of Sodium Content by Atomic Absorption Spectrometry.** Brussels, 2003.

_____ **EN 14109: Fat and Oil Derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME), Determination of Potassium Content by Atomic Absorption Spectrometry.** Brussels, 2003.

_____ **EN 14538: Fat and Oil Derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME), Determination of Ca, K, Mg and Na Content by Optical Emission Spectral Analysis with Inductively Coupled Plasma (ICP OES).** Brussels, 2002.

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T. **Vinte anos de química verde: conquistas e desafios.** Química Nova, 34, 1089-1093. 2011.

FONTANA, J. D. **Biodiesel para leitores de 9 a 90 anos.** Editora UFPR. Curitiba, 2011.

GONZALÉZ, A. G.; HERRADOR, M. Á. **A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles.** Trends in Analytical Chemistry, 26, 227-238. 2006.

GREEN, J. M. **A Practical Guide to Analytical Method Validation.** Analytical Chemistry News & Features. 305-309. 1996.

GRINDLAY, G.; MAESTRE, S.; GRAS, L.; MORA, J. **Introduction of organic solvent solutions into inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry using a microwave assisted sample introduction system.** Journal Analytical. Atomic. Spectrom, 21, 1403-1411. 2006.

HIND, A.; **An Introduction to Optical Spectroscopy.** Disponível em: http://www.agilent.com/labs/features/2011_101_spectroscopy.html, acesso 20 de fevereiro de 2016.

HASHEMI, P.; RAEISI, F.; GHIASVAND, A. R.; RAHIMI, A. **Reversed-phase dispersive liquid–liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein.** *Talanta*, 80,1926–1931. 2010.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos.** Revisão 04, julho de 2011. Disponível em: < <http://www.inmetro.gov.br/>>, acesso em 02 de setembro de 2015.

IQBAL, J.; CARNEY, W, A.; LACAZE, S.; THEEGALA, C, S. **Metals Determination in Biodiesel (B100) by ICP-OES with Microwave Assisted Acid Digestion.** *The Open Analytical Chemistry Journal*, 4, 18-26. 2010.

JAHROMI, E. Z.; BIDARI, A.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. R. M.; JAMALI, M.R. **Dispersive liquid–liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry: ultra-trace determination of cadmium in water samples.** *Analytica Chimica Acta*, 585, 305–311. 2010.

KORDULIS, C.; BOURIKAS, K.; GOUSI, M.; KORDOULI, E.; LYCOURGHIOTIS, A. **Development of nickel based catalysts for the transformation of natural triglycerides and related compounds into green diesel: a critical review.** *Applied Catalysis B: Environmental*, 181, 156-196. 2015.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de Biodiesel.** Capítulos, 4, 5, 6. Sao Paulo: Editora Blucher, 2006.

KNOTHE, G. **Improving Biodiesel Fuel properties by modifying fatty Esters composition.** *Journal Energy & Environmental Science*, 10, 1039-1054. 2009.

KRUG, F. J.; **Métodos de preparo de amostras.** 1ª edição. Piracicaba. 13-15. 2008.

LAJUNEN, L. H. J.; PERÄMÄKI, P. **Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission.** *Royal Society of Chemistry. RSC.* 2004.

LIANG, P.; SANG, H. **Determination of trace lead in biological and water samples with dispersive liquid–liquid microextraction preconcentration.** *Analytical Biochemistry*, 380, 21–25. 2008.

LISBOA, M. T.; CLASEN, C. D.; VELLAR, D. C. S.; ORESTE, E. Q.; SAINT'PIERRE, T. D.; RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A. **An Easy and Fast Procedure for the Determination of Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, Na, K and Si in Biodiesel by ICP OES Using Emulsification as Sample Preparation Strategy.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25, 143-151. 2014.

LIU, S.; XIE, Q.; CHEN, J.; SUN, J.; HE, H.; ZHANG, X. **Development and comparison of two dispersive liquid–liquid microextraction techniques coupled to high performance liquid chromatography for the rapid analysis of bisphenol A in edible oils.** *Journal of Chromatography A*, 295, 16– 23. 2013.

LLORENTI-MARTÍNEZ, E. J.; ORTEGA-BARRALES, P.; FERNÁNDEZ-DE C, M. L. RUIZ-MEDINA, A. **Analysis of the legislated metals in different categories of olive and olive-pomace oils.** Food Control, 22, 221-225. 2011.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L.C.; da CRUZ, R. S. **Biodiesel: Parâmetros de Qualidade e Métodos Analíticos.** Química Nova, 32, 1596-1608. 2009.

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, 124, 106-110. 2014.

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, 167, 396-401. 2015.

L'VOV, B. V. **Fifty Years of Atomic Absorption Spectrometry.** Journal of Analytical Chemistry, 60, 434-446. 2005.

MACIEL, J. V. **Desenvolvimento de método para determinação de ferro e cobre em vinho por espectrofotometria empregando DLLME.** Dissertação de Mestrado. Universidade federal do Rio Grande do Sul- RS. Programa de pós-graduação em química tecnológica e ambiental. 2013.

MANNING, D. C.; CAPACHO-DELGADO, L. **Dissociation and ionization effects in atomic absorption spectrochemical analysis.** Analytica Chimica Acta, 36, 312-318. 1966.

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, 4, 35-51. 2012.

MOREIRA, B. J.; YOKOYA, J. M. C.; GAITANI, C. N. **Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas.** Scientia Chromatographica, 6(3), 186-204. 2014.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. NREL. **A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae.** Disponível em: <<http://www.nrel.gov/>>, acesso em 02 de setembro de 2015.

OH, P. P.; LAU, H. L. N.; CHEN, J.; CHONG, M. F.; CHOO, Y. M. **A review on conventional technologies and emerging process intensification (PI) methods for biodiesel production.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, 16, 5131-5145. 2012.

OLIVEIRA, L. C. C.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; BAPTISTA, P. M.; GONÇALVES, R. A.; CAMPOS, R. C. **Determination of Na, K, Mg and Ca in Biodiesel by LS F AAS and HR-CS F AAS: Studies that Supported the Proposal**

of the ABNT NBR 15556 Norm. Journal of the Brazilian Chemical Society, 23, 1400-1408. 2012.

PRANKL, H.; KÖRBITZ, W.; MITTELBACH, M.; WÖRGETTER, M.; **Review on Biodiesel Standardization World-Wide; Prepared for IEA Bioenergy Task 39, Subtask "Biodiesel"**. Austria. 2004.

QUADROS, D. P. C.; CHAVES, E. S.; SILVA, J. S. A.; TEIXEIRA, L. S. G.; CURTIUS, A. J.; PEREIRA, P. A. P. **Contaminantes em Biodiesel e Controle de Qualidade.** Revista virtual de Química, 5, 376-384. 2011.

RAMAKRISHNA, T. V.; WEST, P. W.; ROBINSON, J. W. **The determination of calcium and magnesium in acetylene flames.** Analytical Chimica Acta, 40, 347-350. 1968.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANCRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. **Tecnologias de Produção de Biodiesel.** Revista virtual de Química, 5, 385-405. 2011.

RAPOSO, J. D.; COSTA, L. M.; BARBEIRA, P. J. S. **Simultaneous Determination of Na, K and Ca in Biodiesel by Flame Atomic Emission Spectrometry.** Journal of the Brazilian Chemical Society, 26, 147-155. 2015.

REYES, M. N. M. e CAMPOS, R. C. **Determination of copper and nickel in vegetable oils by direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry.** Talanta, 70, 929-932. 2006.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINIA, M.; AGHAEI, E.; AHMAD, I. F.; BERIJANI, S. **Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction.** Journal of Chromatography A, 1116,1-9. 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. **Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method.** Journal of Chromatography A, 1217, 2342-2357. 2010.

RIOS, A.; ESCARPA, A.; SIMONET, B. **Portability of Miniaturized Analytical Systems.** John Wiley & Sons, 2009.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V. **Síntese de Biodiesel: uma proposta contextualizada para laboratórios de química geral.** Química Nova, 30, 1374-1380. 2007.

ROSA, F. C.; DUARTE, F. A.; PANIZ, J. N. G.; HEIDRICH, G. M.; NUMES, M. A. G.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. **Dispersive liquid-liquid microextraction: An efficient approach for the extraction of Cd and Pb from honey and determination by flame atomic absorption spectrometry.** Microchemical Journal 123, 211-217. 2015.

SALVI, B. L.; PANWAR, N. L. **Biodiesel resources and production technologies – A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, 16, 3680-3689. 2012.

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

SCHINKEL, H.; FRESENIUS, Z. **Determination of Calcium, Magnesium, Strontium, Potassium, Sodium, Iron, Manganese, Chromium, Nickel, Copper, Zinc and Cadmium by Flame AAS.** Analytical Chemistry. 317, 10-26. 1984.

SCHUHKNECHT, W.; SCHINKEL, H.; FRESENIUS, Z. **Beitrag Zur der Anregungsbeeinflussung bei flamenspektralanalytischen Untersuchungen.** Analytical Chemistry, 164, 161-183. 1963.

SONG, M.; PHAM, H. D.; SEON, J.; WOO, H. C. **Marine brown algae: A conundrum answer for sustainable biofuels production.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, 50, 782-792. 2015.

SPIETELUN, A.; MARCINKOWSKI, L.; GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. **Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques.** Talanta,119, 34–45. 2014.

TRANCHIDA, P. Q.; MAIMONE, M.; PURCARO, G.; DUGO, P.; MONDELLO, L. **The penetration of green sample-preparation techniques in comprehensive two-dimensional gas chromatography.** Trends in Analytical Chemistry, 71, 74-84. 2015.

TRIVEDI, J.; AILA, M.; BANGWAL, D, P.; KAUL, S.; GARG, M, O. **Algae basedbiorefinery – Howtomakesense.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, 47, 295-307. 2015.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry.** New York: Wiley-VCH, 1999.

ZGOŁA-GRZES'KOWIAK, A.; GRZES'KOWIAK, T. **Dispersive liquid-liquid microextraction.** Trends in Analytical Chemistry, 30, 1382-1399. 2011.