



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE  
ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS EM AMOSTRAS DE BIODIESEL POR  
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR  
ELETROQUÍMICO**

**Dannyelle da Silva e Silva**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Domingues Nazário

Campo Grande – MS

2023



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANTIOXIDANTES  
SINTÉTICOS EM AMOSTRAS DE BIODIESEL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE  
ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR ELETROQUÍMICO**

**Dannyelle da Silva e Silva**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química  
da Fundação Universidade Federal de Mato  
Grosso do Sul para obtenção do título de  
Doutor em Química

Área de concentração: Química analítica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Domingues Nazário

Campo Grande – MS

2023

**DEDICATÓRIA**

Agradeço primeiramente A Deus por toda força e proteção.

## AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao meu companheiro Ricardo Coelho, muito obrigada pela força, por todo apoio ao longo deste trabalho e compreensão.
- ✓ Ao professor Dr. Carlos Eduardo Domingues Nazário, por me orientar.
- ✓ A amizade da Kássia, Kristiane, Deyse, Agliane e a equipe do Laboratório (LABCOM), muito obrigada por toda ajuda e apoio.
- ✓ A Karla pela ajuda com a instrumentação e a análises no aparelho Cromatógrafo líquido de alta eficiência.
- ✓ A Laisa pela ajuda com a instrumentação e no aparelho Cromatógrafo líquido de alta eficiência, pela força, apoio, ajuda com qualquer tipo de assunto, pela confiança e principalmente pela linda amizade que construímos desde o início, muitíssimo obrigada por estar presente na minha vida.
- ✓ A Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, aos professores, técnicos e funcionários que também contribuíram para concretização da minha formação, à Vanessa pelo apoio e carinho e em especial ao Sr. Ademar, por todo apoio, disponibilidade, atenção e pela confiança de sempre, muitíssimo obrigada pela amizade.
- ✓ As minhas amigas Adara, Adriane e Laiana, sempre presentes na minha vida (eterno quarteto).
- ✓ Aos meus irmãos Roberison e Rafael Lúcio Martins, amo vocês incondicionalmente.

*Dedico exclusivamente a mulher mais especial que tive o grande prazer de ter sua presença na minha vida, na minha criação. A minha avó e ao mesmo tempo minha “mãe”, muito obrigada por toda sabedoria, força e conhecimento que me ensinou. Uma mulher guerreira, a verdadeira “Amazonas”. Sempre amei você e sempre amarei! Saudades eternas...*

## RESUMO

A busca por energia derivada de fontes renováveis tem aumentado ao longo dos anos e a utilização de combustível renovável com o óleo diesel tem contribuído para o crescimento do mercado brasileiro. O biodiesel possui baixa estabilidade oxidativa quando comparado com combustíveis fósseis, sendo mais propenso a sofrer degradação. Uma alternativa para retardar e/ou inibir a oxidação de compostos lipídicos é a utilização de substâncias conhecidas como antioxidantes. Os antioxidantes têm sido avaliados para utilização no processo de produção do biodiesel, sendo os sintéticos os mais estudados. Tendo em vista solucionar o problema de estabilidade do biodiesel buscou-se informações na literatura para o desenvolvimento de um método simples, viável e eficaz para detecção de antioxidantes sintéticos: Butil-Hidroxianisol (BHA), Galato de Propila (PG) e Terc-Butil-Hidroquinona (TBHQ) simultaneamente pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada com detector UV-Vis e eletroquímico utilizando como eletrodo de trabalho o carbono vítreo sem modificação e sem a necessidade de pré-tratamento de amostra. No método foi empregada a separação por fase reversa, comprimento de onda de 280 nm para detector UV-Vis e célula eletroquímica aplicando-se potencial constante +0,8V. Como resultados obteve-se limites de detecção de 8,16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o antioxidante PG, 7,19  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para TBHQ e 7,92  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para BHA em detecção UV-Vis, em detecção eletroquímica os resultados foram 7,96  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para PG, 7,47  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para TBHQ e 8,18  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para BHA. Os limites de quantificação obtidos foram na faixa entre 23,95 – 27,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para todos os antioxidantes sintéticos nos dois detectores utilizados. Os estudos de recuperação variaram entre 95,78% e 101,66% para os antioxidantes PG, TBHQ e BHA utilizando o detector UV-Vis e entre 99,78% e 100,31% para o detector eletroquímico. O método proposto apresentou viabilidade para detecção e quantificação simultânea de antioxidantes sintéticos em amostra de biodiesel, tendo como principal vantagem a ausência de pré-tratamento de amostra e qualquer tipo de modificação no eletrodo de trabalho, permitindo ser empregada na quantificação de antioxidantes em amostras de biodiesel para monitoramento da estabilidade oxidativa.

Palavras-Chave: Antioxidantes, Biodiesel, Cromatografia, Detecção eletroquímica, Detecção UV-Vis.

## ABSTRACT

The search for energy derived from renewable sources has increased over the years and the use of renewable fuel with as diesel oil has contributed to the growth of the Brazilian market. Biodiesel has low oxidative stability when compared to fossil fuels, being more prone to degradation. An alternative to delay and/or inhibit the oxidation of lipid compounds is the use of substances known as antioxidants. Antioxidants have been evaluated for use in the biodiesel production process, with synthetic ones being the most studied. With a view to solving the biodiesel stability problem, information was sought in the literature for the development of a simple, viable and effective method for the detection of synthetic antioxidants: Butyl-Hydroxyanisole (BHA), Propyl Gallate (PG) and Tert-Butyl -Hydroquinone (TBHQ) simultaneously by the technique of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled with UV-Vis and electrochemical detector using vitreous carbon as working electrode without modification and without the need for pre-treatment of the sample. In the method, reverse phase separation was used, with a wavelength of 280 nm for the UV-Vis detector and electrochemical cell, applying a constant potential of +0.8V. As a result, detection limits of 8.16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  were obtained for the antioxidant PG, 7.19  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for TBHQ and 7.92  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for BHA in UV-Vis detection, in electrochemical detection results were 7.96  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for PG, 7.47  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for TBHQ and 8.18  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for BHA. The quantification limits obtained were in the range between 23.95 – 27.25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for all synthetic antioxidants in the two detectors used. Recovery studies varied between 95.78% and 101.66% for PG, TBHQ and BHA antioxidants using the UV-Vis detector and between 99.78% and 100.31% for the electrochemical detector. The proposed method showed viability for the simultaneous detection and quantification of synthetic antioxidants in a biodiesel sample, having as its main advantage the absence of pre-treatment of the sample and any type of modification in the working electrode, allowing it to be used in the quantification of antioxidants in samples of biodiesel for monitoring oxidative stability.

Keywords: Antioxidants, Biodiesel, Chromatography, Electrochemical detection, UV-vis detection.

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Matéria – prima do Biodiesel .....	20
Figura 2. Produção de Biodiesel.....	21
Figura 3. Evolução do percentual de teor de biodiesel no diesel no Brasil.....	21
Figura 4. Reação de transesterificação.....	22
Figura 5. Esquema geral do auto - oxidação de ácidos graxos insaturados. ....	26
Figura 6. Estrutura química de antioxidantes sintéticos.....	28
Figura 7. Mecanismo geral de ação de antioxidante fenólico .....	28
Figura 8. Esquema do Cromatógrafo Líquido de alta eficiência.....	30
Figura 9. Modelo da estrutura do carbono vítreo proposta por Jenkins e Kawamura.....	33
Figura 10. Esquema da voltametria cíclica.....	35
Figura 11. Esquema da voltametria de pulso diferencial.....	36
Figura 12. Esquema da aplicação da técnica de cronoamperometria de múltiplos pulsos....	37
Figura 13. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE).....	43
Figura 14. Célula de fluxo eletroquímica. ....	44
Figura 15. Detector Eletroquímico – Década II.....	45
Figura 16. Cromatogramas dos padrões de antioxidantes em diferentes proporções de fase móvel. ....	50
Figura 17. Fator de retenção (k) versus a concentração da fase móvel.....	51
Figura 18. Cromatogramas dos antioxidantes sintéticos nas concentrações analisadas no detector UV-Vis.....	54
Figura 19. Cromatograma da otimização dos padrões de antioxidantes utilizando o detector eletroquímico Década II em diferentes potenciais de oxidação: +0,4 V, +0,6 V, +0,8 V e corrente estabelecida em: 20 nA, 50 nA, 100 nA. ....	55



Figura 20. Cromatogramas dos antioxidantes sintéticos nas concentrações analisadas no detector Eletroquímico. ....	56
Figura 21. Cromatogramas do branco de biodiesel na ausência dos antioxidantes sintéticos.....	57
Figura 22. Curva analítica do padrão de antioxidante sintético PG em detector UV-Vis. ....	58
Figura 23. Curva analítica do padrão de antioxidante sintético TBHQ em detector UV-Vis. .	59
Figura 24. Curva analítica do padrão de antioxidante sintético BHA em detector UV-Vis.....	59
Figura 25. Curva analítica dos padrões de antioxidantes sintéticos PG, TBHQ e BHA em detector UV-Vis.....	60
Figura 26. Curva analítica do padrão de antioxidante sintético PG em detector eletroquímico.....	61
Figura 27. Curva analítica do padrão de antioxidante sintético TBHQ em detector eletroquímico.....	62
Figura 28. Curva analítica do padrão de antioxidante sintético BHA em detector eletroquímico.....	62
Figura 29. Curva analítica dos padrões de antioxidantes sintéticos PG, TBHQ e BHA em detector eletroquímico.....	63
Figura 30. Resíduos do padrão de antioxidante sintéticos PG em detector UV-Vis.....	65
Figura 31. Resíduos do padrão de antioxidante sintéticos TBHQ em detector UV-Vis.....	65
Figura 32. Resíduos do padrão de antioxidante sintéticos BHA em detector UV-Vis.....	66
Figura 33. Resíduos do padrão de antioxidante sintéticos PG em detector Eletroquímico..	69
Figura 34. Resíduos do padrão de antioxidante sintéticos TBHQ em detector Eletroquímico..	69
Figura 35. Resíduos do padrão de antioxidante sintéticos BHA em detector Eletroquímico..	70

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1. Especificação do biodiesel.....	24
Tabela 2. Limites de potencial de trabalho para diferentes materiais de eletrodos de trabalho.....	45
Tabela 3. Resultados dos parâmetros de eficiência da coluna.....	53
Tabela 4. Parâmetros das curvas analíticas dos antioxidantes sintéticos PG, TBHQ e BHA em detector UV-Vis .....	60
Tabela 5. Parâmetros das curvas analíticas dos antioxidantes sintéticos PG, TBHQ e BHA em detector eletroquímico.....	64
Tabela 6. Resultados dos dados da ANOVA para o antioxidante PG em detector UV-Vis....	67
Tabela 7. Resultados dos dados da ANOVA para o antioxidante TBHQ em detector UV-Vis. ....	67
Tabela 8. Resultados dos dados da ANOVA para o antioxidante BHA em detector UV-Vis.....	67
Tabela 9. Resultados dos dados da ANOVA para o antioxidante PG em detector Eletroquímico.....	68
Tabela 10. Resultados dos dados da ANOVA para o antioxidante TBHQ em detector Eletroquímico.....	68
Tabela 11. Resultados dos dados da ANOVA para o antioxidante BHA em detector Eletroquímico.....	68
Tabela 12. Resultados Estatísticos do Teste Cochran para os antioxidantes sintéticos nos detectores UV-Vis e Eletroquímico. ....	71
Tabela 13. Resultados da precisão dos ensaios realizados no detector UV-Vis. ....	71
Tabela 14. Resultados da precisão dos ensaios realizados no detector eletroquímico.....	72
Tabela 15. Resultados das médias das recuperações obtidas para os antioxidantes sintéticos: PG, TBHQ e BHA.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM – Sociedade Americana de Teste e Materiais, do inglês, American Society for Testing and Materials

BHA - Butil- Hidroxianisol

CNPE - Conselho Nacional de Política Energética

CVR - Carbono vítreo reticulado

CSN/MS – Conselho Nacional de Saúde de Mato Grosso do Sul

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV - Coeficiente de variação

CMD - Concentração média determinada

C<sub>1</sub> - Concentração do analito na amostra fortificada

C<sub>2</sub> - Concentração do analito na amostra não fortificada

C<sub>3</sub> - Concentração do analito adicionado a amostra fortificada

DPR - Desvio padrão relativo

DP - Desvio padrão

DPV - Técnica voltamétrica de pulso diferencial

DOQ – Documento orientativo da qualidade

CGCRE – Coordenação Geral de Acreditação

DAD – Arranjo de diodos, do inglês, diode-array detector

EN – Norma Europeia, do inglês, European Standards

FLEX - Célula de fluxo eletroquímica

g – Grama

EPH – Eletrodo de Referência Padrão de Hidrogênio

INQUI – Instituto de Química

k - Fator de retenção

KOH – Hidróxido de potássio

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

L<sub>a</sub> - Intralamelar

L<sub>c</sub> – Interlamelar

m<sup>2</sup> – Metro quadrado

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

N - Número de pratos teóricos

NBR – Norma Brasileira

nA – nanoamperes

pH – Potencial hidrogeniônico

PG - Galato de Propila

PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel

R\* - Radical livre

ROO\* - Radical péroxido

ROOH – Radical hidroperóxido

r - Coeficiente de correlação linear;

Rs - Resolução cromatográfica

TBHQ - Terc-Butil Hidroquinona

tr - Tempo de retenção

tR - Tempo de retenção do analito

tm - Tempo morto

tR<sub>A</sub> - Tempo de retenção do pico adjacente A

tR<sub>B</sub> = Tempo de retenção do pico adjacente B

UV/Vis - Ultravioleta-visível

V – Volts

W<sub>A</sub> - Largura do pico A na sua base, em unidades de tempo

W<sub>B</sub> - Largura do pico B na sua base, em unidades de tempo

α - Fator de separação

μL – Microlitro

μg – Micrograma

**ÍNDICE GERAL**

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	OBJETIVOS .....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	19
3.1	BIODIESEL .....	19
3.2	ESTABILIDADE OXIDATIVA.....	25
3.3	ANTIOXIDANTES .....	27
3.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .....	29
3.5	TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS .....	32
3.5.1	Carbono vítreo .....	32
3.5.2	Voltametria cíclica .....	34
3.5.3	Voltametria pulso diferencial .....	35
3.5.4	Cronocronoamperometria .....	36
4	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA .....	38
4.1	SELETIVIDADE .....	38
4.2	LINEARIDADE .....	39
4.3	FAIXA LINEAR.....	40
4.4	PRECISÃO.....	40
4.5	LIMITE DE DETECÇÃO .....	40
4.6	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....	41
4.7	EXATIDÃO .....	41
5	METODOLOGIA.....	42
5.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	42
5.2	PREPARO DAS AMOSTRAS .....	42
5.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .....	43
5.3.1	Otimização do método.....	44
5.4	CÉLULA ELETROQUÍMICA.....	44
5.4.1	Otimização do método.....	46

5.5	MÉTODO CROMATOGRÁFICO .....	46
5.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO .....	47
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
6.1	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO NO DETECTOR UV-VIS .....	49
6.2	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO NO DETECTOR ELETROQUÍMICO.....	54
6.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	57
6.3.1	Seletividade .....	57
6.3.2	Linearidade, Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) .....	58
6.3.3	Precisão .....	71
6.3.1	Recuperação .....	72
7	CONCLUSÃO.....	75
8	PERSPECTIVAS.....	76
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

O biodiesel é um biocombustível renovável, produzido a partir de óleos de origem vegetal como, por exemplo, soja, mamona, dendê, algodão, entre outras e/ou gordura animal, também conhecido como triacilglicerídeos. Sua obtenção se dá pela reação destes triacilglicerídeos com um álcool na presença de um catalisador, no qual após a reação o biodiesel e o glicerol são produzidos (SCHAUMLOFFEL, L. S., 2019). A utilização do biodiesel em motores a diesel tem se ampliado ao longo dos anos, por ser uma fonte de energia que minimiza a emissão de gases poluentes ao meio, apresenta maior disponibilidade de matéria-prima, menor risco de contaminação ao meio ambiente durante seu transporte e possibilidade de crescimento econômico, auxiliando na redução da dependência do uso somente de combustíveis fósseis como fonte de energia (ANDRADE, D. F., 2012; PIVA, R. B., 2010; SILVA, S. D., 2012).

Apesar de ser uma fonte alternativa de energia, o biodiesel possui em sua composição quantidades significativas de ácidos graxos insaturados, estes provenientes da matéria – prima de sua obtenção, que favorecem a reação de oxidação quando em contato com o ar atmosférico, entre outros fatores que podem acelerar essas reações como a presença de luz, altas temperaturas, metais, umidade (PAVANELLO, G. P., 2017).

Visando a diminuição da oxidação e a formação de subprodutos indesejáveis, a adição de algumas substâncias químicas, estas são capazes de reduzir o processo de oxidação e tem sido alvo de pesquisas para melhorar a estabilidade destes. Substâncias essas denominadas antioxidantes que são espécies químicas que auxiliam na inibição das reações de oxidação.

Os antioxidantes são substâncias que auxiliam a retardar a oxidação dos lípidios (processos oxidativos) e podem ser de origem natural ou sintética. Os antioxidantes sintéticos possuem compostos fenólicos que aumentam a resistência do biodiesel à oxidação, apresentam em suas estruturas o anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, alguns exemplos de antioxidantes sintéticos são: butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ). Os antioxidantes naturais também possuem boa eficácia referente à oxidação, pois são renováveis e menos poluentes, como por exemplo os tocoferóis que encontram-se presentes nos óleos vegetais (milho, soja, entre outros) mas sofrem degradação devido a altas temperaturas para obtenção de biodiesel, ou seja, na composição do biodiesel podem ser encontrados em baixas concentrações (CASAGRANDE, S., 2017,



PAVANELLO, G. P., 2017).

As técnicas eletroanalíticas têm sido amplamente utilizadas para avaliação de antioxidantes, pois possuem uma ampla aplicação em diversas áreas como alimentícia, medicinal, ambiental, bioquímica, entre outras. Entre essas técnicas eletroanalíticas, as técnicas voltamétricas envolvem a medição de propriedades elétricas como por exemplo, diferença de potencial, corrente elétrica, acúmulo de cargas e reações de oxidação – redução em célula eletroquímica sob condições de completa polarização (anódica ou catódica) de concentração (OLIVEIRA, G. K. F., 2017).

A utilização de detectores eletroquímicos com o princípio das técnicas voltamétricas por exemplo, são também empregados junto a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para avaliar a eficácia de eletrodos modificados ou não, determinação e/ou avaliação da capacidade de antioxidantes em diferentes amostras, pois a cromatográfica líquida de alta eficiência é uma técnica que por meio da realização de separações, permite análises quantitativas de vários compostos com uma alta resolução e eficiência (PAVANELLO, G. P., 2017; CASAGRANDE, 2017; MONTEIRO, T. O.; TANAKA, A. A.; SAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S., 2017).

Devido a preocupação com a degradação do biodiesel, o presente trabalho visa o desenvolvimento de um método alternativo, viável e eficaz para detecção e quantificação de antioxidantes sintéticos: Butil-Hidroxianisol (BHA), Galato de Propila (PG) e Terc-Butil-Hidroquinona (TBHQ) simultaneamente pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada com detector UV-Vis e detector eletroquímico utilizando como eletrodo de trabalho o carbono vítreo sem modificação e sem a necessidade de pré-tratamento de amostra.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolvimento de metodologia analítica para detectar antioxidantes sintéticos: Butil-Hidroxianisol (BHA), Galato de Propila (PG) e Terc-Butil Hidroquinona (TBHQ) simultaneamente em amostra de biodiesel utilizando detector UV-Vis e Eletroquímico.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Desenvolver um método alternativo para detecção e quantificação de antioxidantes sintéticos em biodiesel diluído em metanol.
- ✓ Otimizar o método para detecção e quantificação de antioxidantes BHA, PG e TBHQ em amostra de biodiesel utilizando detector UV-vis.
- ✓ Otimizar método para detecção e quantificação de antioxidantes BHA, PG e TBHQ em amostra de biodiesel utilizando detector Eletroquímico.
- ✓ Validação do método proposto para detecção e quantificação de antioxidantes BHA, PG e TBHQ simultaneamente em amostra de biodiesel em detector UV-Vis e detector eletroquímico.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 BIODIESEL

O biodiesel apresenta inúmeras vantagens em relação aos combustíveis fósseis como fonte de energia, pois não é tóxico, é biodegradável e reduz a emissão de poluentes ao meio ambiente.

O biodiesel é um exemplo de biocombustível renovável, produzido a partir de óleos de origem vegetal como, por exemplo, soja, mamona, dendê, algodão, entre outras e/ou animal, também conhecido como triacilglicerídeos. Sua obtenção é a partir da reação destes triacilglicerídeos com um álcool na presença de um catalisador, produzindo o biodiesel e glicerol (SCHAUMLOFFEL, L. S., 2019).

Cabe ressaltar o que dispõe a Resolução nº45 de 25 de Agosto de 2014 da Agência Nacional de Petróleo (ANP), a qual estabelece a especificação do biodiesel contida no Regulamento Técnico ANP nº 3/2014 e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional e conceitua o biodiesel como:

um combustível derivado de biomassa renovável composto de alquil ésteres de ácido carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal e animal (BRASIL, 2014, [s.p]).

A utilização do biodiesel em motores a diesel tem se ampliado ao longo dos anos, por ser uma fonte de energia que minimiza a emissão de materiais particulados ao meio, acarretando na redução da dependência da utilização somente de combustíveis fósseis como fonte de energia, podendo também ser favorável na economia desde que seja aceita sua comercialização (ANDRADE, D. F., 2012).

A matéria – prima mais utilizada no Brasil para produzir o Biodiesel é a soja, com cerca de 65,9% do total da produção do primeiro trimestre de 2022, seguida de “outros materiais graxos” que contempla mistura de matérias – primas em tanque a reprocessamento de sub-produtos gerados na produção do biodiesel (BRASIL, 2022). Na figura 1 pode-se observar a distribuição das matérias – primas utilizadas no Brasil para produção de biodiesel no primeiro trimestre de 2022.

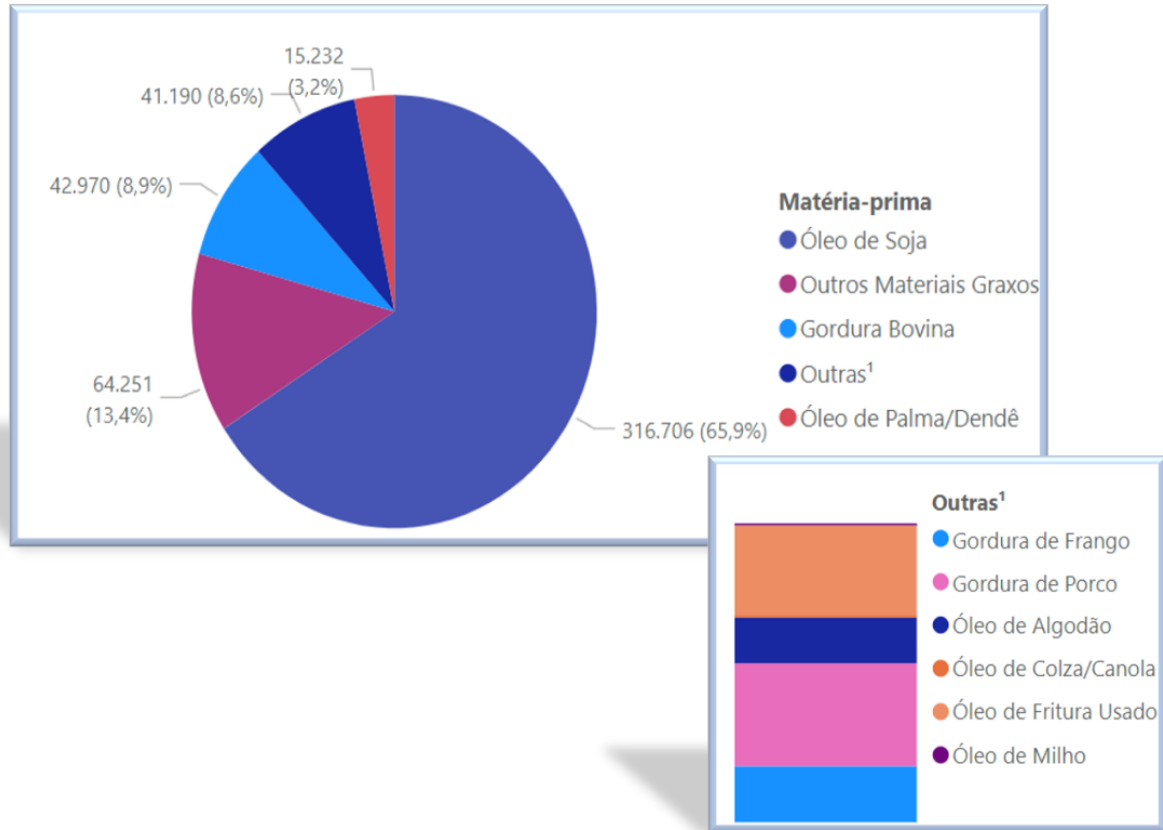


Figura 1. Matéria – prima do Biodiesel

Fonte: (BRASIL, 2022).

A capacidade total de produção de biodiesel é de aproximadamente 26.600 m<sup>3</sup>/dia, o Brasil possui atualmente 51 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela Agência Nacional de Petróleo e estão distribuídas em todas as cinco grandes regiões do país. Esta produção de biodiesel no Brasil está centralizada principalmente na região Sul com aproximadamente 42,8% e região Centro – Oeste com aproximadamente 40,5%. Dados da ANP informam que a produção de biodiesel no ano de 2021 foi de aproximadamente 6.758.382 m<sup>3</sup> (BRASIL, 2022). A figura 2 apresenta a distribuição da produção de biodiesel nas regiões do Brasil.

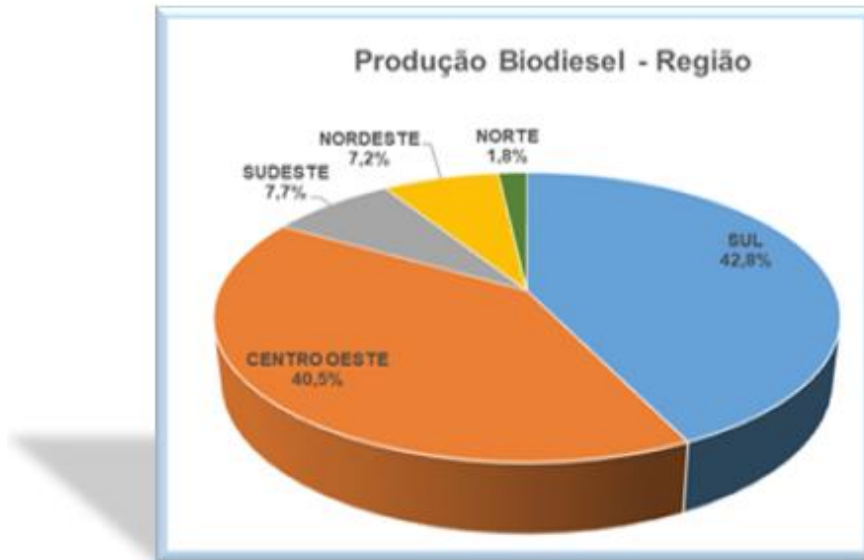


Figura 2. Produção de Biodiesel

Fonte: (BRASIL, 2022).

O programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) teve início em 2004, com experimentos da mistura de biodiesel ao diesel fóssil e em anos seguintes com a introdução do combustível na matriz energética nacional, com ênfase na inclusão social e desenvolvimento regional. Tornou-se obrigatória a adição de 2% de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final em 2008 e foi sucessivamente ampliando esta quantidade no decorrer dos anos, com o limite máximo atual permitido de 15% (GATO, F. S., 2016 e ANP, 2014). Pode-se observar na figura 3 a evolução do percentual de teor de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final desde 2008.



Figura 3. Evolução do percentual de teor de biodiesel no diesel no Brasil.

Fonte: (BRASIL, 2014).

Vale ressaltar que o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) através da Resolução nº 25 de 22 de novembro de 2021, manteve o teor de mistura obrigatória do biodiesel no óleo diesel ao longo de 2022 em 10%, devido ao aumento significativo do preço do óleo de soja, aliado à desvalorização cambial sendo assim uma alternativa para conciliar os aspectos ambientais, sociais e econômicos (BRASIL, 2021).

Na obtenção de biodiesel a reação tradicional mais utilizada é a transesterificação, em que os triacilglicerídeos presentes em óleo vegetal e/ou gordura animal reagem com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador, produzindo glicerol e alquilésteres, conhecido como biodiesel. Os álcoois usualmente utilizados para a reação são o etanol e metanol, sendo este último mais reativo e auxiliando para que a reação ocorra em menor tempo (DURIGAN, B., 2014; SCHAUMLOFFEL, L. S., 2019; DELFINO, J. R., 2014).

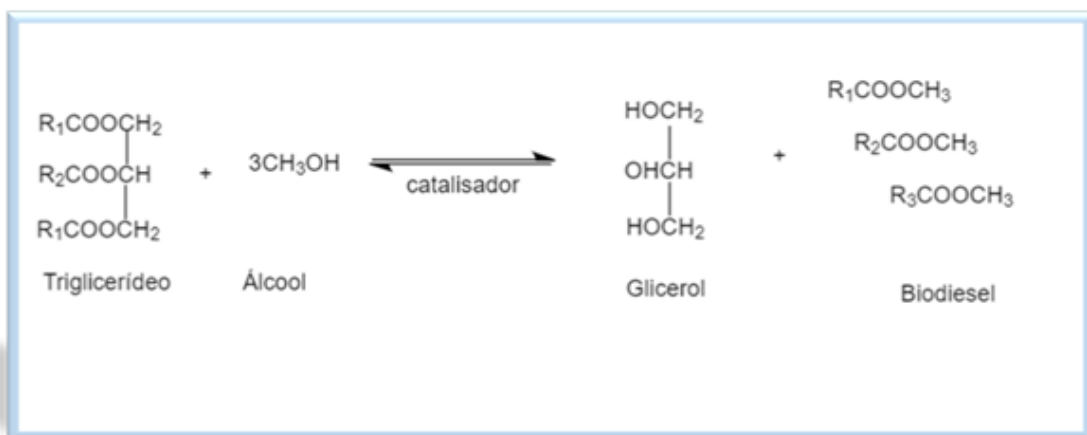


Figura 4. Reação de transesterificação.  
Fonte: (Própria).

Na reação de transesterificação a proporção usual são três mols de álcool que reagem com o triglicerídeo da matéria-prima na presença de um catalisador e produz três mols de ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) e o glicerol. Nesta reação podem ser utilizados catalisadores homogêneos, heterogêneos ou enzimáticos. Os catalisadores mais utilizados são os homogêneos e básicos pois favorecem um bom rendimento em tempos menores de reação e em baixas temperaturas comparados com outros catalisadores. Os catalisadores heterogêneos apresentam como vantagem um menor custo durante o processo de produção e os catalisadores enzimáticos utilizam enzimas extracelulares e intracelulares em meio aquoso ou não e apresentam como vantagem a fácil remoção do glicerol formado, mas necessita de tempos elevados de reação e alto custo de produção (GATO, F. S., 2016, SILVA, E. S., 2017).

Apesar de ser uma fonte de energia alternativa, o biodiesel possui baixa estabilidade

oxidativa, ou seja, devido à alta presença de ácidos graxos insaturados em sua composição que podem acarretar em processos oxidativos e influenciar a qualidade, tendo como principal desvantagem na etapa de estocagem. Outras desvantagens relacionadas são a formação de depósitos no motor, entupimento do filtro, absorção de umidade, entre outras (RODRIGUES, J. S., 2020; UGUZ, G. et al, 2019).

Para avaliação da qualidade do biodiesel produzido e garantia de que não prejudique os motores a diesel, existem parâmetros de suas características que são avaliados conforme métodos estabelecidos por órgãos internacionais e nacionais, como a ASTM (American Society for Testing and Materials), Métodos Europeus (EN/ISO), ABNT-NBR (Associação Brasileira de Normas Técnicas) que opera em parceria com a Agência Nacional de Petróleo (ANP) para regulamentar normas, monitorar e fiscalizar a produção de biodiesel. Com isto, a Agência Nacional de Petróleo desenvolveu algumas resoluções como, por exemplo, a Resolução nº45, de 25 de Agosto de 2014 que estabelece especificações de características do biodiesel, como o limite do teor de água, teor de éster, enxofre, índice de acidez, índice de iodo, aspecto, entre outros e a Resolução nº798, de 1 de Agosto de 2019 que visa especificações do biodiesel comercializado com novo limite mínimo para a característica relacionada à estabilidade oxidativa. Tais limites que devem ser respeitados para a comercialização do biodiesel (BRASIL, 2014; BRASIL, 2019).

Tabela 1. Especificação do biodiesel

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1) (2)	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m <sup>3</sup>	850 a 900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm <sup>2</sup> /s	3,0 a 6	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água, máx.	mg/kg	200 (3)	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx. (Redação dada pela Resolução ANP Nº 51/2015).	mg/kg	24	15995	-	EN12662 (5)
Ponto de fulgor, mín. (4)	°C	100	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín.	% massa	96,5	15764	-	EN 14103 (5)
Cinzas sulfatadas, máx. (6)	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	15867	5453	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 (5) EN 14109 (5) EN 14538 (5)
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538 (5)
Fósforo, máx. (7)	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107 (5) EN 16294 (5)
Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C, máx. (6)	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número Cetano (6)	-	Anotar	-	613 - 6890 (8)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	(9)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,5	14448 - 15771	664 - 6584 (5)	EN 14104 (5) EN 14105 (5)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15908 (5)	-	EN 14106 (5)
Glicerol total, máx. (10)	% massa	0,25	15344 15908 (5)	6584 (5) -	EN 14105 (5)
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,7	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,2	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,2	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,2	15343	-	EN 14110 (5)
Índice de Iodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111 (5)
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín. (Redação dada pela Resolução ANP Nº 798 DE 01/08/2019).	hora	12			EN 14112 (5) EN 15751 (5)



Nota:

- (1) Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura de ensaio.
- (2) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade no Aspecto, deverão ser realizadas as análises de teor de água e contaminação total.
- (3) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade, será admitida variação de +50 mg/kg no limite do teor de água no biodiesel para o produtor e de +150 mg/kg para o distribuidor.
- (4) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130°C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.
- (5) Os métodos referenciados demandam validação para os materiais graxos não previstos no método e rota de produção etílica.
- (6) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da Tabela de Especificação a cada trimestre civil.
- (7) Em caso de disputa, deve ser utilizado o método EN 14107 como referência.
- (8) O método ASTM D6890 poderá ser utilizado como método alternativo para determinação do número de cetano.
- (9) Limites conforme Tabela II. Para os estados não contemplados na tabela o ponto de entupimento a frio permanecerá 19°C.
- (10) Poderá ser determinado pelos métodos ABNT NBR 15908, ABNT NBR 15344, ASTM D6584 ou EN14105, sendo aplicável o limite de 0,25% em massa. Para biodiesel oriundo de material graxo predominantemente láurico, deve ser utilizado método ABNT NBR 15908 ou ABNT NBR15344, sendo aplicável o limite de 0,30% em massa.

Fonte: (BRASIL, 2014).

Devido a diversidade da origem dos óleos vegetais para a obtenção de biodiesel, pesquisas avaliam a composição com presença de ligações duplas nas cadeias de ácidos graxos que podem ser favoráveis para a oxidação do biodiesel em buscas de melhores resultados para minimizar a reação de oxidação em etapas finais de produção, como o armazenamento e transporte do biodiesel. (DEVARAJAN, Y. D., 2020; RODRIGUES, J. S., 2020; GATO, F. S., 2016).

### **3.2 ESTABILIDADE OXIDATIVA**

A capacidade que uma amostra possui de suportar a mudanças físicas e químicas diante de uma perturbação no sistema como no caso do biodiesel a processo oxidativo pode ser denominada de estabilidade oxidativa. A degradação do biodiesel influencia diretamente em sua qualidade, estudos indicam que quanto maior o teor de ácidos graxos insaturados em sua molécula menor a estabilidade oxidativa do biodiesel (GATO F.A., 2016, PAVANELLO, G. P., 2017).

O biodiesel possui em sua composição quantidades significativas de ácidos graxos insaturados, estes provenientes da matéria – prima de sua obtenção, que favorecem a reação de oxidação quando em contato com o ar atmosférico por exemplo, outros fatores que podem acelerar essas reações são a presença de luz, altas temperaturas, metais, umidade (PAVANELLO, G. P., 2017).

A reação de auto-oxidação do biodiesel é um exemplo de processo oxidativo mais comum no qual divide-se em três etapas: iniciação, propagação e término. Na etapa de iniciação ocorre a eliminação de um átomo de hidrogênio do carbono na posição alílica do ácido graxo insaturado presente no biodiesel na presença de luz por exemplo, produzindo radicais livres.

Na etapa de propagação o radical alquila (ou radical livre) ( $R^*$ ) formado na etapa inicial reage com o oxigênio formando o radical péroxido ( $ROO^*$ ), este pode reagir com outro hidrogênio do carbono alílico de outra molécula de éster produzindo hidroperóxido ( $ROOH$ ) e outro radical de ácido graxo insaturado, este processo ocorre em cadeia, os produtos formados nesta etapa são denominados de produtos primários da oxidação. A etapa de término produz compostos mais estáveis através da combinação dos radicais peróxido ( $ROO^*$ ) e radicais livres ( $R^*$ ) que sofrem rearranjo formando os denominados produtos secundários de oxidação que podem ser aldeídos, ácidos, entre outros (BHARTI, R.; SINGH, B 2020; FALCÃO, H. R.C, 2016, PAVANELLO, G. P., 2017). A figura 5 demonstra o esquema geral do auto oxidação de ácidos graxos insaturados.

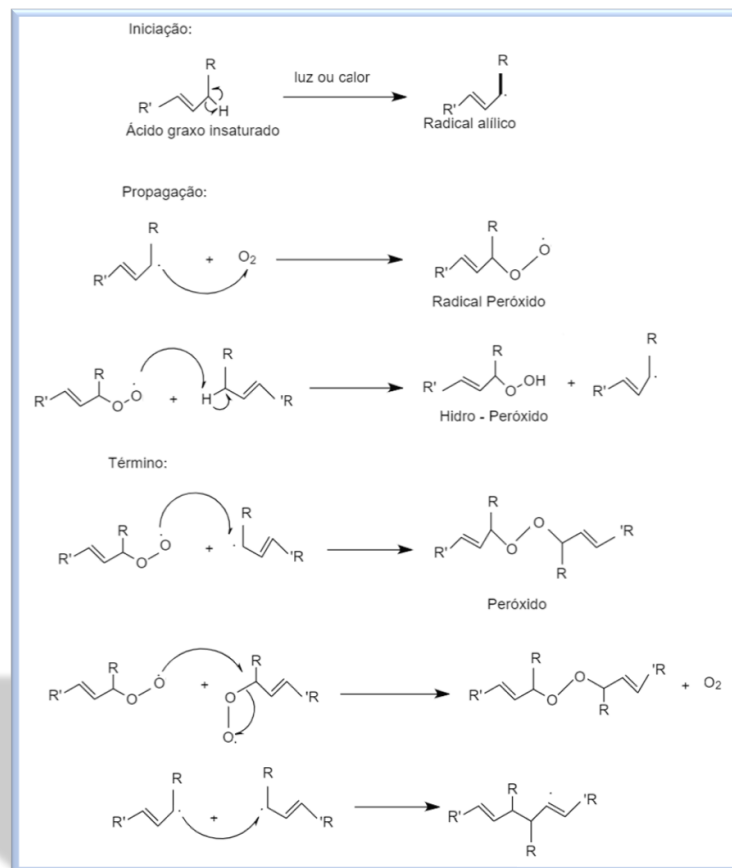


Figura 5. Esquema geral do auto - oxidação de ácidos graxos insaturados

Fonte: (Própria).

Os subprodutos formados pelo processo de oxidação do biodiesel podem provocar danos em peças do motor, geração de incrustações, entupimento de filtro, entre outros. A ANP recomenda métodos certificados como norma Europeia e Brasileira para avaliarem a estabilidade oxidativa de amostras do biodiesel, como por exemplo o teste acelerado Rancimat em que a amostra sofre decomposição térmica, gerando subprodutos voláteis que são arrastados por fluxo de ar até uma célula de medição contendo água deionizada que a condutividade é monitorada e medida para obtenção do período de indução, este que é definido com o tempo (em horas) entre o início da medição da estabilidade oxidativa e o tempo no qual ocorre o aumento significativo na formação dos produtos da reação de oxidação. (FREITAS, O.N., 2015, SILVA, E. S., 2017).

Segundo a Resolução ANP N° 798 de 2019 o limite mínimo para a estabilidade oxidativa para comercialização do biodiesel a 110 °C é de 12 horas. Pesquisas têm sido realizadas em busca de melhores resultados para o tempo de indução em diferentes amostras de biodiesel (RODRIGUES, J. S., 2020; SILVA, G. B., 2015, GATO, F. S., 2016).

Visando a diminuição da oxidação e assim a formação de subprodutos indesejáveis, a adição de algumas substâncias químicas capazes de interferir no processo de oxidação tem sido alvo de pesquisas. Os também denominados de antioxidantes são espécies químicas que auxiliam na inibição das reações de oxidação.

### **3.3 ANTIOXIDANTES**

Conforme mencionado anteriormente, os antioxidantes são substâncias que retardam a oxidação dos compostos lipídicos e são utilizados no biodiesel para promover melhores resultados da estabilidade oxidativa.

Os antioxidantes sintéticos são poucos solúveis em água, apresentam maior solubidade em álcoois, baixa estabilidade em altas temperaturas e boa eficiência na presença de triacilglicerídeos, reagem através da doação de um próton no qual formam radicais livres estáveis e com isso inibem a oxidação lipídica. Alguns estudos indicam que o terc-butil-hidroquinona (TBHQ) apresenta melhores qualidades em relação aos demais antioxidantes sintéticos, pois também age como inibidor de corrosão (CASAGRANDE, S., 2017, MORETTI, E. S., 2016).

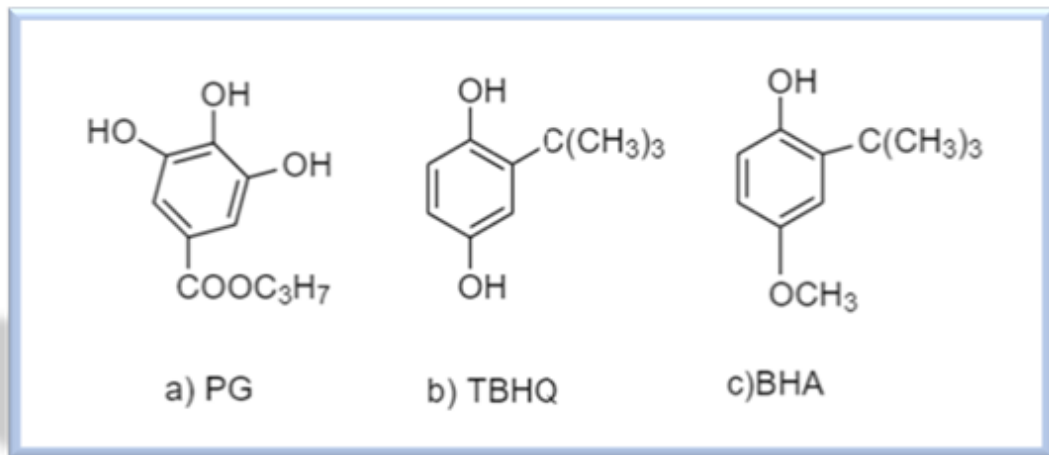


Figura 6. Estrutura química de antioxidantes sintéticos.

Fonte: (Própria).

O mecanismo geral de ação de um antioxidante fenólico ocorre pela doação de um átomo de hidrogênio para o radical livre do ácido graxo, inibindo a formação de radicais livres e impedindo assim a reação em cadeia de propagação da oxidação, formando espécies inativas para a reação e um radical inerte procedente do antioxidante, este último estabiliza-se por ressonância.

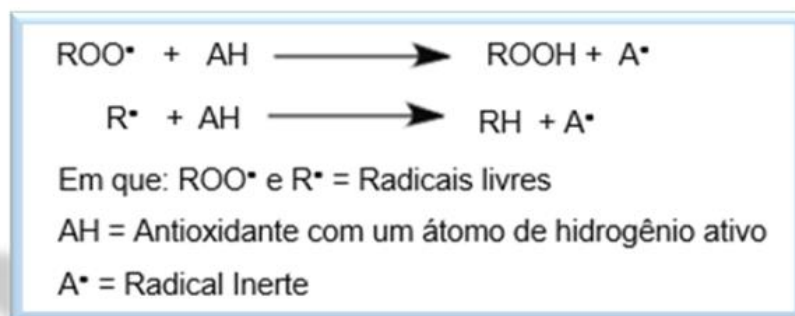


Figura 7. Mecanismo geral de ação de antioxidante fenólico.

Fonte: (própria).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) especifica na Resolução CSN/MS n.º 04, de 24 de novembro de 1988 limites máximos de alguns antioxidantes em alimentos, para Butil-hidroxianisol (BHA) e Terc-butil-hidroquinona (TBHQ) o limite máximo permitido é 200 mg/kg, para Butil-hidroxitolueno (BHT) e Galato de propila (PG) o limite máximo permitido é 100 mg/kg. A ANP não possui um limite específico para utilização destes antioxidantes sintéticos em biodiesel.

Pesquisas têm sido realizadas em busca de melhores resultados para auxiliarem na inibição da oxidação do biodiesel utilizando antioxidantes sintéticos com técnicas

voltamétricas e/ou cromatográficas para que assim seja possível o armazenamento em maior tempo (SILVA, G. B., 2015, ANDRADE, A. G. F, et al, 2015, SOUZA, D. A. A., et al, 2021).

### 3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O termo “cromatografia” deriva de palavras gregas, “chrom” significa cor e “grafe” significa escrever. Teve início com experimentos de separação dos componentes de extratos de folhas em 1906 pelo botânico russo Mikhael Semenovich Tswett que comprovou a separação e identificação de pigmentos de folhas utilizando uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel. A partir disto, diversas experiências foram investigadas por diferentes cientistas em busca de um maior conhecimento no assunto (SÁ PLOÊNCIO, L. A, 2016; COLLINS et al., 2017).

Entre a década de 60 e 70 pesquisadores como, por exemplo, Snyder e Kirkland comprovaram que era possível obter resultados satisfatórios e rápidos como os obtidos em cromatografia gasosa utilizando colunas em vidro e bombas sob pressão, em fase móvel líquida com detecção sensível, sendo denominada como cromatografia líquida clássica. O diâmetro interno das colunas eram de 10 cm, recheadas com partículas de 60 a 200  $\mu\text{m}$ , no qual o recheio da coluna era feito manualmente e sendo utilizada uma única vez, o eluente fluía através da coluna devido à pressão reduzida no qual as frações das amostras eram coletadas manualmente e a detecção e quantificação demoravam um tempo muito grande para sua coleta e os resultados eram registrados sob forma de cromatograma em forma de gráfico de concentração da amostra *versus* o número de fração (SKOOG, D. A. et al, 2006; SÁ PLOÊNCIO, L. A., 2016).

Atualmente a cromatografia líquida é realizada em colunas fechadas, podendo ser realizada inúmeras separações individuais com a mesma coluna e os sistemas automatizados. Muitas técnicas de separação de misturas de compostos são utilizadas, mas a cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido empregada para detecção e/ou quantificação de misturas com biodiesel. (CASAGRANDE, 2017).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica que proporciona a realização de separações e análises quantitativas de vários compostos e misturas de diferentes tipos de amostras com uma alta resolução, eficiência e em um curto período de tempo, ou seja, em minutos. Apresenta duas fases: a fase móvel e a fase estacionária, a fase móvel consiste em um líquido que escoar ao longo da fase estacionária, no qual os analitos que interagem mais fortemente com a fase móvel apresentam um tempo de eluição menor, enquanto os

que possuem maior interação com a fase estacionária apresentam um tempo de eluição maior (COLLINS et al., 2017).

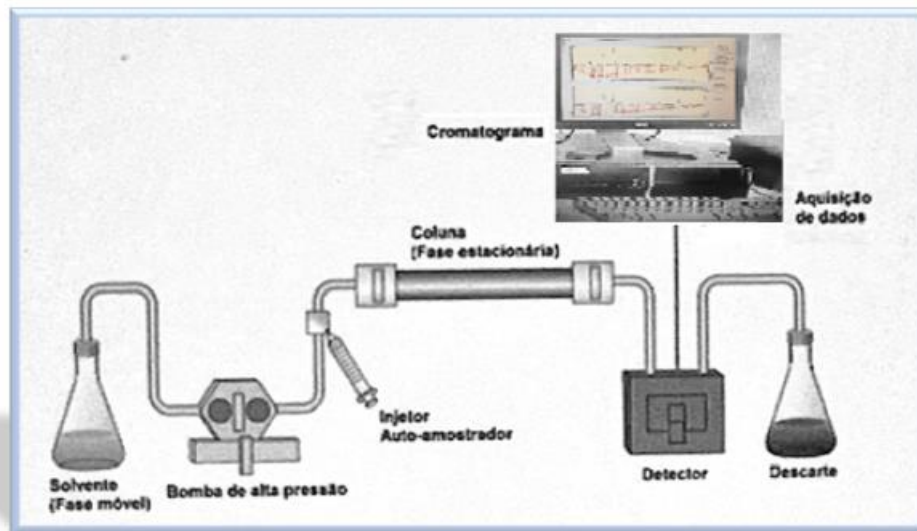


Figura 8. Esquema do Cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Fonte: (Própria).

A instrumentação utilizada por esta técnica adota colunas empacotadas (comprimento de 3,0 a 25,0 cm e diâmetro interno de 2,0 a 5,0 mm), com sistemas de válvulas com capacidade de injeções com volume em microlitros ( $\mu\text{L}$ ), modo de operação em fase normal em que se utiliza uma fase estacionária polar para retenção dos analitos polares e fase reversa que a separação é baseada nas forças de atração entre os solutos apolares e os grupos funcionais também apolares, amostradores automáticos e um sistema de bombas operando em altas pressões com vazões na faixa de  $0,1$  a  $10,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e fases estacionárias constituídas por micro-partículas ( $3 - 10 \mu\text{m}$  de diâmetro), o que auxilia na eficiência da análise (COLLINS et al., 2017, SKOOG, D. A. et al, 2006).

A eluição da fase móvel pode ser isocrático ou gradiente, a primeira trata-se da eluição da fase móvel utilizando um solvente puro ou misturas de solventes sem alteração da composição durante toda a separação. A eluição em modo gradiente refere-se a alteração da composição da fase móvel durante a separação, ou seja, um aumento gradativo da força cromatográfica (DELFINO, J. R., 2019).

Diferentes mecanismos de separação podem ser empregados na cromatografia líquida de alta eficiência como, por exemplo: a cromatografia por adsorção, por partição, com fase quimicamente ligada, quiral, troca iônica, exclusão, entre outras. No entanto, as mais utilizadas são a cromatografia por adsorção e partição (COLLINS et al., 2017, SKOOG, D. A. et al, 2006).

A cromatografia líquida por adsorção baseia – se basicamente na disputa entre a molécula da amostra e as da fase móvel, para ocupar os sítios ativos na superfície da fase estacionária. A adsorção dos analitos presentes nas amostras é realizada pela interação das polaridades com a fase móvel ou com a fase estacionária, o grau de retenção depende da polarização de cada grupo funcional presente na amostra (COLLINS et al., 2017; SKOOG, D. A. et al, 2006).

A cromatografia líquida por partição é baseada na diferença de solubilidade dos compostos da amostra na fase móvel e na fase estacionária, ou seja, os analitos mais solúveis na fase estacionária serão retidos por ela, ao mesmo tempo em que os menos solúveis serão transportados mais rapidamente pela fase móvel (COLLINS et al., 2017; SKOOG, D. A. et al, 2006).

Detectores espectrofotométricos são utilizados acoplados a cromatografia líquida de alta eficiência com princípio de medir de forma contínua a propriedade física ou físico-química da amostra, enviando um sinal para identificação dos analitos de interesse em diversas misturas de amostras, recorre a um tipo específico de detector de acordo com cada propriedade a ser medida. A resposta é medida em forma de gráfico com a variação da concentração dos analitos em função do tempo de eluição, ou seja, um cromatograma que podem informar o tempo de retenção ( $t_r$ ) de cada composto na coluna cromatográfica e sua respectiva área de pico que é proporcional a sua concentração (SILVA, T. M. L., 2019; ).

Estes detectores apresentam como características uma alta seletividade, sensibilidade e boa estabilidade, podendo também operar em uma ampla faixa de comprimento de onda variável, o que pode possibilitar a detecção de compostos em baixíssimas concentrações. Atualmente pesquisas têm utilizado a combinação de duas ou mais técnicas de detecção, para obtenção de melhores resultados de identificação de compostos (DELFINO, J. R., 2019).

Os detectores mais utilizados em cromatográfica líquida, por exemplo, são: o detector por espectroscopia de ultravioleta-visível (UV/Vis) que medem a quantidade de luz absorvidas pelas amostras, estas que absorvem radiação eletromagnética, o detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, detector eletroquímico que detecta compostos orgânicos durante a reação de oxidação ou redução, detector de índice de refração que acompanha a diferença de índice de refração entre o eluente que sai da coluna contendo os compostos de interesse a fase móvel pura, entre outros. (SKOOG, D. A. et al, 2006; CASAGRANDE, 2017; SILVA, T. M. L., 2019).

### 3.5 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

As técnicas eletroanalíticas têm sido bastante utilizadas para avaliação de antioxidantes, possuem uma ampla aplicação em diversas áreas como alimentícia, medicina, química ambiental, bioquímica, entre outras. Técnicas voltamétricas envolvem a medição de propriedades elétricas como por exemplo, diferença de potencial, corrente elétrica, acúmulo de cargas e reações de oxidação – redução em célula eletroquímica sob condições de completa polarização (anódica ou catódica) de concentração, onde a velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo limita a velocidade da reação de oxidação ou de redução (OLIVEIRA, G. K. F., 2017).

A célula eletroquímica empregada nestas técnicas pode ser composta por dois e/ou três eletrodos. A composição com três eletrodos é definida com o eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar, no qual o potencial é aplicado no eletrodo de trabalho e o auxiliar evita a ocorrência de distúrbios, ou seja, tem a função de manter o potencial aplicado constante e sendo possível assim medir a corrente resultante da reação. A corrente resultante de uma reação redox é denominada de corrente faradaica e a corrente não – faradaica ou também denominada de corrente capacitiva, é a corrente gerada devido a presença de um acúmulo de elétrons na superfície do eletrodo (ALMEIDA, L. G. B. F., 2018; DE RESENDE, M. A. C.; DA SILVA, D. N.; PEREIRA, A. C., 2020; SKOOG, D. A. et al, 2006).

O eletrodo de trabalho utilizado pode ser de diferentes materiais como por exemplo carbono, ouro, prata, platina, cobre, entre outros. Tais técnicas apresentam como vantagem uma ampla utilização com soluções diluídas, boa sensibilidade e menor custo quando comparados com outras técnicas (OLIVEIRA, F. M., 2019; SKOOG, D. A. et al, 2006).

#### 3.5.1 Carbono vítreo

O carbono vítreo é um material sólido a temperatura ambiente, não metal, possui hibridização do tipo  $sp^2$  e pode ser obtido do elemento químico carbono, este último que pode ser encontrado na natureza em abundância, apresenta diversas formas alotrópicas como o diamante, grafeno, fulerenos e nanotubos. Tais materiais carbonosos podem assumir combinações estruturais variadas devido a suas estruturas poliméricas (SILVA, R. S. R., 2020).

Diversas formas de carbono têm sido utilizadas como eletrodos, devido ao baixo custo quando comparados com eletrodos metálicos, por exemplo, eletrodos de ouro e platina. O carbono vítreo é conceituado como uma estrutura de um emaranhado de fitas entrelaçadas de carbono que exibem uma ordenação (bidirecional) em meio de uma estrutura complexa e



similar à de um polímero e o nome vítreo é referente ao seu aspecto brilhante (LIMA, D., 2016).

O carbono vítreo é um exemplo de material carbonoso que apresenta diversas aplicações industriais, como em baterias de íons de lítio, fabricação de eletrodos, indústrias de engenharia por exemplo. É um material obtido através da pirólise, ou seja, a partir de resinas termorrígidas como, por exemplo, resina fenólica ou furfurílica em processos que exigem altas temperaturas que podem influenciar a estrutura do material e proporcionar bons rendimentos em carbono. (CONEJO, L. S., 2019).

Este carbono que resulta na estrutura complexa com aspecto rígido e amorfo, ou seja, são estruturas sólidas e consistentes, no qual podem ser obtidos o carbono vítreo, carbono vítreo reticulado em forma de poros como espumas denominadas de carbono vítreo reticulado (CVR) e o carbono polimérico vítreo. Suas estruturas podem apresentar longas fitas que se entrelaçam e conectam-se formando uma rede complexa com característica como baixa cristalinidade, impermeável a gases ou uma estrutura de grande proporção com poros fechados com pouca capacidade de absorção de  $\text{CO}_2$  (CONEJO, L. S., 2019, LIMA, D., 2016).

A primeira estrutura proposta para o carbono vítreo foi de Jenkins e Kawamura na década de 70, no qual propuseram uma estrutura semelhante ao de polímero com curvas de fitas torcidas de carbono grafítico com microporos unidos, ou seja, uma estrutura denominada turbostática onde  $L_a$  é o tamanho do microcristalito intralamelar e  $L_c$  é o tamanho do microcristalito interlamelar (LIMA, D., 2016).

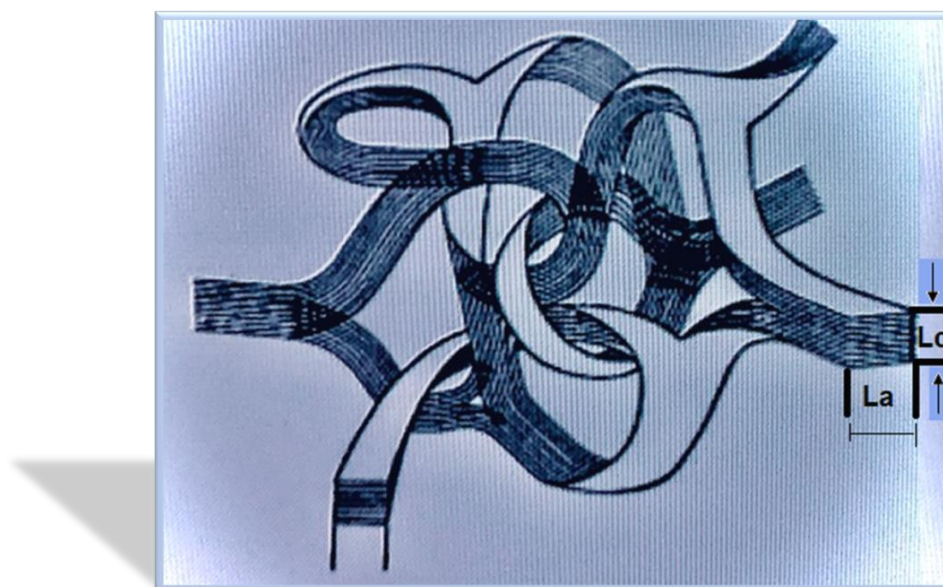


Figura 9. Modelo da estrutura do carbono vítreo proposta por Jenkins e Kawamura.

Fonte: (Própria).

O carbono vítreo reticulado, por exemplo, apresenta uma estrutura com poros abertos, similar a uma esponja e tem como principais características: alta área superficial, semicondutor, resistência química e física favorecendo assim sua aplicação com eletrodos em ensaios analíticos e eletroquímicos. O Eletrodo de carbono apresentam alta reprodutibilidade, estabilidade quando comparado com outros eletrodos, pois apresentam baixa adsorção de impurezas e alta área superficial (SILVA, R. S. R., 2020).

Diversas pesquisas têm utilizado eletrodos à base de carbono vítreo em análises eletroquímicas, pois é um material que proporciona uma alta área superficial, boa estabilidade e favorece a detecção de compostos em baixas concentrações. (MORETI, E. S., 2016) sintetizou um sensor eletroquímico a partir da deposição da suspensão do nanocompósito baseado em poli (ácido metacrílico-hemina) sobre a superfície de eletrodo de carbono vítreo com uma alta seletividade para TBHQ e através de técnicas eletroquímicas verificou sua viabilidade para determinação simultânea de antioxidantes em matrizes lipídicas e biodiesel com uma boa estabilidade, simplicidade e reprodutibilidade no preparo.

(TANG, J. et al, 2018) utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de eosina Y via ciclagem contínua para determinação simultânea de antioxidantes em amostras de óleos comestíveis e obteve como resultados uma excelente atividade eletrocatalítica para oxidação de BHA e TBHQ, apresentando excelente condutividade e com resultados de concentrações para os antioxidantes semelhantes aos obtidos por métodos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### 3.5.2 Voltametria cíclica

A técnica de voltametria cíclica baseia-se na varredura de potencial de forma linear alternando entre crescente e decrescente (potencial inicial para potencial final) em relação a referência, que varia com o tempo no qual ocorre a reação de oxidação e/ou redução de espécies eletroativas presentes na solução resultando em uma corrente capacitiva do carregamento da dupla camada elétrica. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente. Esta técnica apresenta como principais vantagens ser simples e possibilita uma análise do comportamento eletroquímico do analito ou da superfície do eletrodo. Abaixo a representação dos tipos de voltamogramas gerados por este método.

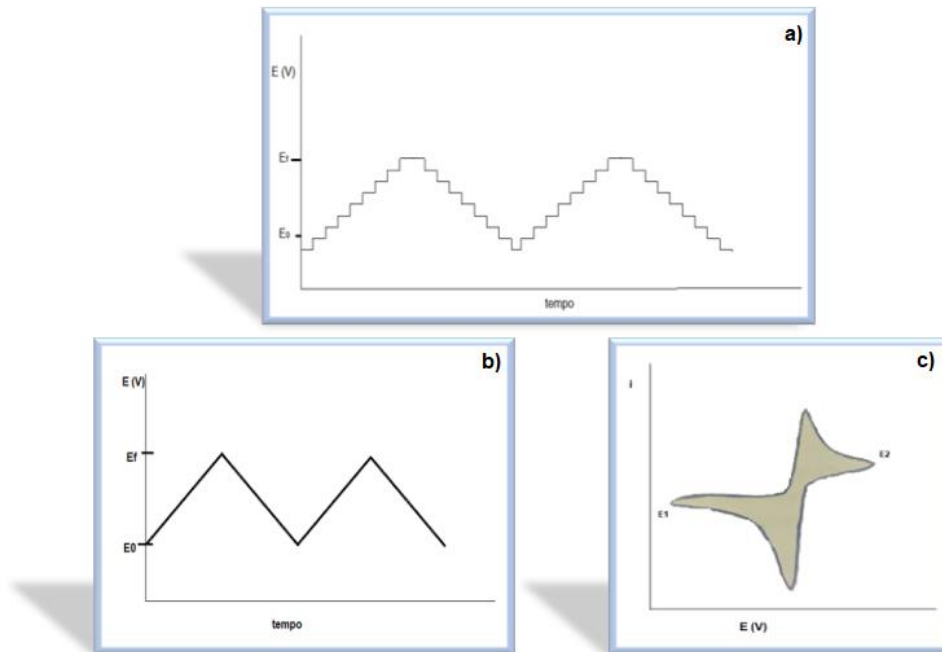


Figura 10. Esquema da voltametria cíclica.

- a) Potencial tipo escada, b) Potencial com varredura linear e c) Voltamograma para sistema reversível.

Fonte: (Própria).

Os voltamogramas podem indicar em que região de potencial ocorre a reação de oxidação e/ou redução do composto de interesse, bem como informar a respeito da quantidade de elétrons envolvidos e formação de possíveis espécies intermediárias.

### 3.5.3 Voltametria pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial é uma técnica eletroquímica que a medição da corrente é realizada antes do decaimento do pico, ou seja, as medições da corrente são feitas alternadamente, no início do pico inicial e antes da aplicação do pulso final. A altura do pico é diretamente proporcional a concentração do analito. Esta técnica apresenta uma maior sensibilidade quando comparada com a voltametria normal, apresenta limites de detecção menores devido aos eventos que ocorrem na camada superficial em torno do eletrodo a medida que o potencial aplicado aumenta, caso haja alguma espécie reativa haverá um pico de corrente como resposta, que diminui assim a concentração do reagente, à medida que a concentração de equilíbrio da reação é alcançada, ocorre o decrescimento do sinal da corrente controlada pela difusão (ALMEIDA, L. G. B. F., 2018).

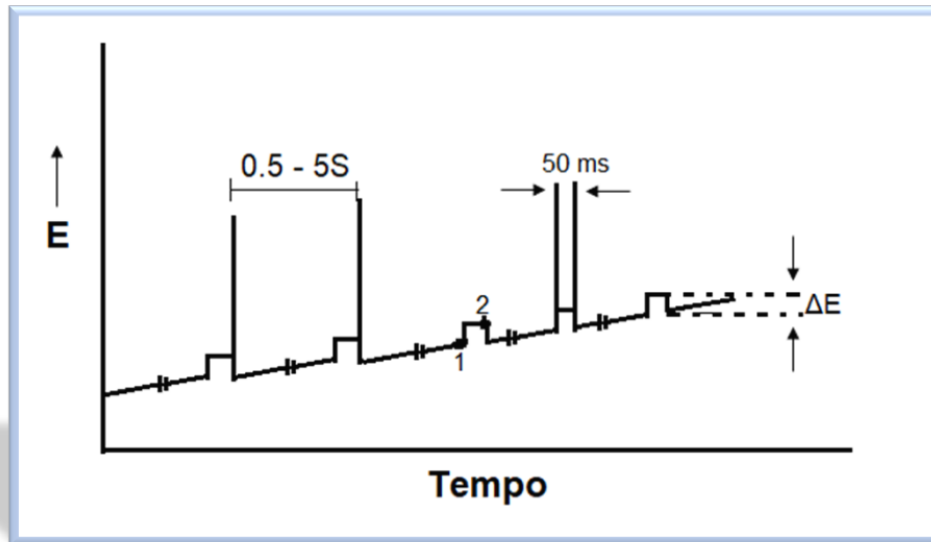


Figura 11. Esquema da voltametria de pulso diferencial.

Fonte: (Própria).

#### 3.5.4 Cronocronoamperometria

A cronocronoamperometria é uma técnica de alta sensibilidade, que avalia a corrente que flui pelo eletrodo de trabalho em função do tempo enquanto é aplicado um potencial constante no qual ocorre a reação de oxidação ou redução. Pode ser aplicada para diferentes objetivos e conforme a intensidade varia com o tempo, podem desenvolver resultados diversos de corrente em função de potencial ou tempo (OLIVEIRA, F. M., 2019).

Esta técnica pode ser aplicada, por exemplo, para avaliação do desempenho de compósitos de grafeno com nanopartículas de óxidos de metais de transição, desenvolvimento de metodologias para determinação de parâmetros cinéticos utilizando eletrodos complexos de ferro sobre um eletrodo de carbono vítreo comercial, desenvolvimento de método amperométrico utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com polímero de impressão molecular e óxido de grafeno e nanopartículas de níquel, entre outros ( OLIVEIRA, F. M., 2019; ALMEIDA, T. S. D, 2021, BELUOMINI, M. A.; SILVA, J. L. e STRADIOTTO, N.R., 2018).

Na técnica de cronoamperometria é aplicado um potencial constante no eletrodo de trabalho onde ocorre a reação de oxidação e/ou redução do composto de interesse, produzindo um sinal elétrico que é proporcional a concentração do analito e é absorvido pelo detector, sendo registrado através de um gráfico também conhecido como amperograma. A taxa de transferência de carga (elétrons) entre o eletrodo e a espécie presente na interface do eletrodo é responsável pela estabilidade do sinal eletroquímico, a superfície dos eletrodos pode ser modificada a qualquer momento, dependendo do tipo do composto que

está envolvido no processo (DE RESENDE, M. A. C.; DA SILVA, D. N.; PEREIRA, A. C., 2020; STRATMANN, A. S. S., 2020).

Ao aplicar um potencial fixo no eletrodo, ocorre a geração de corrente capacitiva que é proveniente do carregamento da dupla camada elétrica do eletrodo e a mesma torna-se constante, ou seja, com valores muito baixos, o que favorece medições de correntes faradaicas baixíssimas (ALMEIDA, T. S. D, 2021).

Esta técnica apresenta como vantagens em comparação com outros métodos eletroquímicos, uma maior sensibilidade, menores efeitos de contaminação da superfície do eletrodo de trabalho (devido ao tempo de contato com a amostra ser menor), maior estabilidade e detecção em baixas concentrações (STRATMANN, A. S. S., 2020).

A cronoamperometria pode ser de três tipos: convencional, pulsada e múltiplos pulsos, estas duas últimas são muito utilizadas para complementar a cronoamperometria convencional, auxiliando assim na limpeza dos eletrodos de trabalho que podem ser contaminados com impurezas durante a reação. A utilização de potenciais múltiplos ou uma variação de potencial aplicado pode realizar a ativação e/ou limpeza do eletrodo de trabalho proporcionando um melhor sinal eletroquímico.

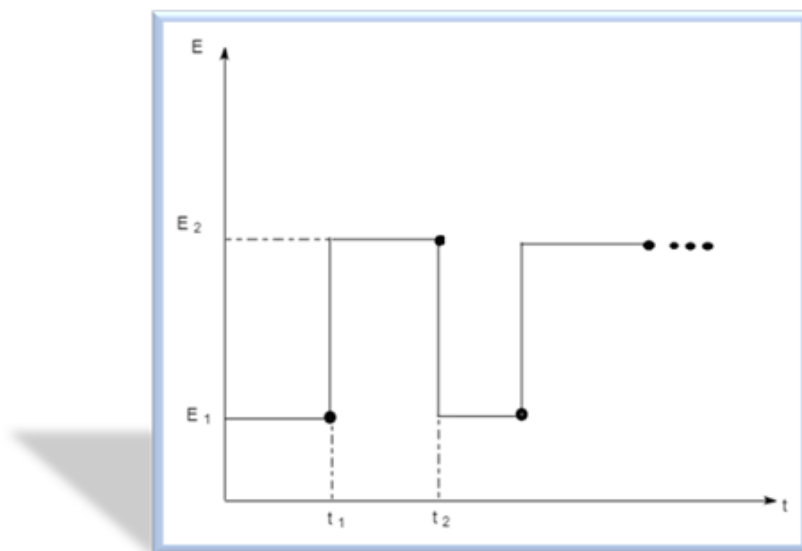


Figura 12. Esquema da aplicação da técnica de cronoamperometria de múltiplos pulsos.

Fonte: (Própria).

A utilização de detectores eletroquímicos com o princípio das técnicas voltamétricas, por exemplo, são também empregados com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência

(CLAE) para avaliar a eficácia de eletrodos modificados ou não, determinação e/ou avaliação da capacidade de antioxidantes em diversas amostras, pois a cromatografia proporciona uma boa separação, sensibilidade e seletividade (PAVANELLO, G. P., 2017; CASAGRANDE, 2017; MONTEIRO, T. O.; TANAKA, A. A.; SAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S., 2017).

#### **4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA**

A validação de um método analítico é a qualificação por meio de evidências experimentais que comprovem a confiabilidade de uma metodologia, ou seja, que o método proposto segue as exigências específicas (para cada tipo de metodologia) afim de gerar resultados fundamentados, específicos e reprodutíveis. Tais exigências englobam alguns parâmetros distintos e requisitados por órgãos normativos como por exemplo o Inmetro e a Anvisa, no qual definem limites próprios para cada tipo de análise que pode ser qualitativa, quantitativa ou ambas (BRASIL, 2017; BRASIL, 2020).

O processo de validação é contínuo, tendo início geralmente com um planejamento das características, objetivos, critérios, materiais, medições analíticas e demais condições experimentais para seu desenvolvimento e implementação, afim de obter dados que comprovem sua finalidade e veracidade.

Em análises cromatográficas por exemplo, os parâmetros de desempenho geralmente solicitados de controle para a validação de um método são: seletividade, linearidade, faixa linear, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão (BRASIL, 2020).

##### **4.1 SELETIVIDADE**

A seletividade é um parâmetro que avalia a capacidade do método de medir uma ou mais substâncias na presença de interferentes, estes que podem ser impurezas, componentes da matriz, produtos de degradação. O intuito é avaliar se a separação foi realizada com ausência de interferentes, ou seja, somente da substância desejada. Matriz são todos os constituintes no qual a substância de interesse também pode estar presente (BRASIL, 2020).

Alguns interferentes presentes na matriz da amostra podem prejudicar os resultados de uma análise causando incremento ou redução do sinal (resposta do instrumento utilizado), ou seja, uma avaliação do efeito matriz é uma alternativa para verificar tais influências. Geralmente é realizado com o uso de padrões ou materiais de referência, no qual é realizada uma comparação da matriz com adição de padrão com a substância de interesse

e outra matriz somente da substância de interesse, afim de averiguar a total separação (BRASIL, 2020).

## 4.2 LINEARIDADE

No método analítico, a linearidade pode ser definida como a competência que o método possui em fornecer resultados confiáveis e que sejam diretamente equivalentes as concentrações da substância analisada por meio de uma relação linear. É retratada em forma de gráficos das respostas dos sinais do instrumento *versus* concentrações da substância analisada (BRASIL, 2020; SKOOG, D. A. et al, 2006).

A relação linear é verificada geralmente pelo método dos mínimos quadrados (MMQ) que consiste em uma técnica matemática que fornece informações a respeito do ajuste de um conjunto de dados, sendo calculados os valores da soma dos quadrados das diferenças entre resultados estimados e resultados observados. Alguns parâmetros são avaliados como coeficiente de correlação linear ou também coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), que foi desenvolvido por Karl Pearson e Francis Galton em um estudo entre duas variáveis estatísticas na década de 90, que apresenta uma menor dispersão do conjunto de dados experimentais e correlação com ajuste ideal dos dados para a linha de regressão com coeficiente de correlação entre 0,999 e 1,0000 (SILVA, T. M. L., 2019; SKOOG, D. A. et al, 2006).

A curva analítica é dependente das características e propriedades da substância a ser analisada juntamente com a técnica aplicada, ou seja, o deslocamento na resposta do instrumento é diretamente proporcional às modificações na quantidade a ser medida. Para validação de um método é necessária definição de uma faixa de trabalho inicial com concentrações em nível: baixo, médio e alto, deve-se definir valores que estejam dentro da faixa utilizada nas análises realizadas para que assim seja viável a determinação da curva de calibração. De acordo com o Inmetro são necessários no mínimo cinco (5) concentrações para construção da curva (BRASIL, 2017; BRASIL, 2020).

Para quantificação de métodos a linearidade é expressa matematicamente pela equação da reta, que relaciona duas variáveis, e pode ser alcançada também a partir da curva de calibração.

$$Y = ax + b$$

Em que:  $a$  = coeficiente linear (interseção com eixo  $y$ , quando  $x$  = zero)

$b$  = coeficiente angular (inclinação da curva)

x = concentração

Y = resposta medida no instrumento utilizado na análise (sinal do instrumento)

#### **4.3 FAIXA LINEAR**

A faixa linear de um método é o intervalo das concentrações que são convergentes, ou seja, a faixa de concentração da substância desejada que apresenta resultados satisfatórios e precisos (BRASIL, 2020).

#### **4.4 PRECISÃO**

A precisão de um método é avaliada a partir de medições em diferentes concentrações da substância analisada em mais de uma vez verificando-se se há discordância ou não entre seus resultados. Alguns critérios são analisados como a repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária (BRASIL, 2017; BRASIL, 2020).

A repetibilidade é a avaliação da substância analisada em diferentes concentrações, o mesmo método utilizado nas análises, bem como o mesmo equipamento, mesmo reagente e demais condições experimentais definidas e em um curto intervalo de tempo (BRASIL, 2020).

A reprodutibilidade é analisada quando se utiliza o mesmo método, mesma lote de amostra e com as concentrações estabelecidas, mesmas condições de análises experimentais que a repetibilidade, mas em outro laboratório e com outro analista, pois avalia-se o grau de concordância entre os resultados obtidos.

A precisão intermediária é o critério no qual se avalia o resultado de mudanças que ocorrem no laboratório durante as análises, como por exemplo, a medição da amostra em diferentes dias, a medição realizada por diferentes analistas ou até mesmo em outro equipamento, ou seja, é a avaliação dos resultados realizados em diferentes dias (BRASIL, 2017; BRASIL, 2020).

#### **4.5 LIMITE DE DETECÇÃO**

O limite de detecção é a menor concentração ou massa que pode detectar a substância analisada utilizando a respectiva metodologia e condições experimentais definidas. Pode ser obtido a partir do desvio padrão do branco (matriz sem a substância desejada) com o coeficiente angular da curva analítica, ou também pelos parâmetros da curva analítica (BRASIL, 2020; SKOOG, D. A. et al, 2006).



#### **4.6 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO**

O limite de quantificação é a menor quantidade que se pode ser determinada com um nível confiável de credibilidade da substância analisada conforme método e condições experimentais definidos. É obtido a partir do desvio padrão do branco com o coeficiente angular da curva analítica ou também pode-se obter utilizando os parâmetros da curva analítica (BRASIL, 2017; SKOOG, D. A. et al, 2006).

#### **4.7 EXATIDÃO**

A exatidão é definida como a relação entre o resultado encontrado e o valor verdadeiro, ou seja, é a concordância dos resultados obtidos das concentrações com os valores aceitos para um valor medido (SKOOG, D. A. et al, 2006)

Pode ser estimada conforme a abordagem mais adequada para cada tipo de método, ou seja, pode ser por comparação a partir de métodos validados, por adição de padrão com quantidades conhecidas, utilizando equipamento de referência certificados pelo Inmetro, entre outros. A exatidão também pode ser apresentada em termos de erro absoluto ou erro relativo, ou ainda pela relação de percentual de recuperação da substância analisada com concentração média, determinada experimentalmente e teórica correspondente (BRASIL, 2017; SKOOG, D. A. et al, 2006).

## 5 METODOLOGIA

As análises foram realizadas no laboratório de Combustíveis do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

### 5.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os padrões analíticos de antioxidantes foram fornecidos pelo professor Dr. Valdir Souza Ferreira.

Os padrões de antioxidantes sintéticos utilizados foram: Butil-Hidroxianisol (BHA) da Sigma-Aldrich (lote B1253), Galato de Propila (PG) da Sigma-Aldrich (lote 109K0051) e Terc-Butil-Hidroquinona (TBHQ) da Sigma-Aldrich (lote MKBD4390V).

O solvente utilizado foi o metanol 99,8 % com grau de pureza HPLC Gradiente (Êxodo Científica) e água deionizada em sistema osmose reversa (Osmose Reversa-Purify) acidificada com 0,1% de ácido acético (Synth) (v/v).

Utilizou-se uma coluna de fase reversa Zorbax SB – C18 (150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro externo e partícula de 5 µm, respectivamente da Agilent Technologies).

Utilizou-se a balança analítica eletrônica modelo FA2104N para pesagem e preparação das soluções estoque e trabalho. Também foi utilizado o agitador vortex da marca Nova Instruments e o refrigerador do laboratório LABCOM.

### 5.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As soluções dos padrão de antioxidantes sintéticos: Butil-Hidroxianisol (BHA), Galato de Propila (PG) e Terc-Butil-Hidroquinona (TBHQ), foram preparadas (10 mg de cada padrão foi pesado) e dissolvidos em 10 mL de metanol 99,8 % HPLC gradiente (Êxodo Científica). Prepararam-se soluções estoque para todos os padrões BHA, PG e TBHQ na concentração  $1.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e por seguinte soluções de trabalho a partir da solução estoque, diluindo em água deionizada em sistema osmose reversa (Osmose Reversa-Purify) homogeneizadas em agitador vortex da marca Nova Instruments.

A amostra de biodiesel foi produzida pelo grupo de pesquisa do laboratório LP3 da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, a amostra foi preparada a partir de óleo de soja por rota metálica, sem adição de antioxidantes.

As soluções trabalho de biodiesel foram preparadas e diluídas em água deionizada em

sistema osmose reversa (Osmose Reversa-Purify), a partir de soluções estoque de concentração  $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em metanol 99,8 % HPLC gradiente (Êxodo Científica) e homogeneizadas em agitador vortex.

As soluções trabalho utilizadas para a elaboração das curvas de calibração foram feitas nos dias das análises, por adição de padrão e foram preparadas a partir de alíquotas da solução estoque de cada padrão de antioxidante e também do biodiesel diluídas em água deionizada em sistema osmose reversa (Osmose Reversa-Purify) em sete níveis de concentrações em triplicata na faixa entre  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  -  $180 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

As soluções estoques foram armazenadas em freezer e as soluções trabalho armazenadas em ambiente refrigerado a aproximadamente  $6^\circ\text{C}$  no laboratório LABCOM.

### 5.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As análises foram realizadas por cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da Shimadzu, modelo Prominence 20A, com bomba quaternária LC 20AT, controladora CBM 20<sup>a</sup>, amostrador com autoinjeter SIL 20A, desgaseificador DGU 20A5, detector UV-VIS SPD-20A (DAD), detector eletroquímico Década II da Antec Scientific. Utilizaram-se duas fases móveis: fase móvel A composta de água deionizada em sistema osmose reversa (Osmose Reversa-Purify) acidificada com 0,1% de ácido acético (Synth) (v/v) e a fase móvel B composta de metanol 99,8% HPLC gradiente (Êxodo Científica).



Figura 13. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE).

Fonte: (Própria).

### 5.3.1 Otimização do método

Para desenvolvimento do método analítico, primeiramente realizou-se um levantamento bibliográfico em busca de melhores condições cromatográficas para realização do método. A otimização dos padrões de antioxidantes no detector UV-vis, no qual a eluição foi monitorada na porção ultravioleta do espectro e as quantificações foram realizadas com um detector UV-Vis operando em modo varredura a uma faixa de 190 - 400 nm. A proporção da fase móvel também foi avaliada para que fosse possível obtenção de melhores resoluções para os antioxidantes.

## 5.4 CÉLULA ELETROQUÍMICA

As medidas amperométricas foram realizadas usando um detector eletroquímico Década II da Antec Scientific, empregando um sistema com uma célula de fluxo eletroquímica (Flex) com volume efetivo de 0,5  $\mu\text{L}$ , constituída de três eletrodos, que inclui o carbono vítreo como eletrodo de trabalho (com diâmetro entre 0,7- 3 mm), um eletrodo auxiliar de fio de aço inoxidável e um eletrodo de hidrogênio como eletrodo de referência (eletrodo padrão de hidrogênio), a solução de eletrólito foi a própria fase móvel (pH = 3,71).



Figura 14. Célula de fluxo eletroquímica.

Fonte: (Própria).

Neste trabalho utilizou-se o eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, devido as suas características em análises eletroquímicas como uma alta área superficial, boa estabilidade e favorecimento na detecção de compostos em baixas concentrações. A tabela 2 apresenta limites de potenciais elétricos de diferentes eletrodos de trabalho que podem ser utilizados na célula eletroquímica.

Tabela 2. Limites de potencial elétrico de trabalho para diferentes materiais de eletrodos de trabalho.

Material	Limites de Potenciais (V)			
	Alcalino		Ácido	
<b>Carbano Vítreo</b>	-1,500	+0,600	-0,800	+1,300
<b>Ouro</b>	-1,250	+0,750	-0,350	+1,100
<b>Platina</b>	-0,900	+0,650	-0,200	+1,300
<b>Prata</b>	-1,200	+0,100	-0,550	+0,400
<b>Níquel</b>	-	+0,600	-	+0,400
<b>Cobre</b>	-	+0,200	-	+0,600

Fonte: (ANTEC, L., 2009).

Foi realizada uma busca na literatura dos potenciais de oxidação para cada antioxidante e a partir desta informação avaliou-se o melhor potencial para aplicação no detector eletroquímico com intuito de analisar o comportamento de cada antioxidante por cronoamperometria, e tendo em vista que a técnica consiste da aplicação de um valor único de potencial aplicado para todos os três antioxidantes (ANDRADE, A. G. F., et al, 2015; CASAGRANDE, 2017).



Figura 15. Detector Eletroquímico – Década II.

Fonte: (Própria).

#### 5.4.1 Otimização do método

Para a otimização do método utilizando o detector eletroquímico foram avaliados diferentes potenciais de oxidação para os três antioxidantes BHA, PG e TBHQ: iniciando primeiramente com +0,4 V, e posteriormente com + 0,6 V, + 0,8 V e 1,2 V aplicando-se diferentes correntes: primeiramente com 20 nA, 50 nA e por último com 100 nA. Com ênfase no acompanhamento da atividade de oxidação dos antioxidantes simultaneamente tendo como eletrodo de trabalho o carbono vítreo sem modificação e com a solução de eletrólito sendo a própria fase móvel: fase móvel A composta de água deionizada em sistema Osmose Reversa acidificada com 0,1% de ácido acético (Synth) (v/v) a fase móvel B composta de metanol 99,8% HPLC gradiente (Êxodo Científica).

### 5.5 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A validação do método analítico proposto foi realizada utilizando as técnicas: cromatografica e eletroquímica simultaneamente em amostra de biodiesel com adição de padrões de antioxidantes BHA, PG e TBHQ.

A validação do método no cromatógrafo líquido de alta eficiência foi realizada configurando o forno a temperatura de aproximadamente 40°C com volume de injeção de 13 µL com vazão da fase móvel de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, comprimento de onda 280 nm e utilizando uma coluna de fase reversa Zorbax SB – C18 (150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro externo e partícula de 5 µm respectivamente da Agilent Technologies). Utilizou-se o software LC Solution (Shimadzu) para obtenção dos dados e controle dos módulos do sistema. A proporção da Fase móvel utilizada foi de: fase móvel A 40%:Fase móvel B 60%, no modo de eluição isocrático.

Para validação do método proposto na célula eletroquímica de fluxo foi definido após a otimização do potencial de oxidação para os três padrões de antioxidantes BHA, PG e TBHQ em +0,8V e corrente de 50 nA, pois apresentaram os melhores resultados. Com a solução de eletrólito a própria fase móvel: fase móvel A composta de Água Deionizada em sistema Osmose Reversa (Osmose Reversa-Purify) acidificada com 0,1% de Ácido Acético (Synth) (v/v), a fase móvel B composta de Metanol 99,8% HPLC Gradiente (Êxodo Científica), na proporção 40:60% (v/v) apresentando um pH de 3,71 e temperatura do forno mantida em 40°C.

A validação foi realizada através de soluções trabalho com a adição de quantidades conhecidas dos padrões de antioxidantes: BHA, PG e TBHQ e biodiesel preparadas em triplicata para sete níveis de concentração na faixa de trabalho entre 40 µg.mL<sup>-1</sup> - 180 µg.mL<sup>-1</sup>.

## 5.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Para a obtenção dos resultados das curvas de calibração, utilizou-se o programa Microsoft Excel para realização dos cálculos.

Para avaliar a viabilidade do método proposto utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência e cronoamperometria (técnica eletroquímica) em amostra de biodiesel sem necessidade de pré-tratamento utilizou-se como referência as especificações do Inmetro, através do documento DOQ-CGCRE-008 analisando os seguintes parâmetros para a validação: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

A seletividade do método foi avaliada com análise do branco do biodiesel, sem presença de antioxidantes sintéticos.

A linearidade foi avaliada por meio das curvas analíticas construídas por ensaios em triplicatas para os sete níveis de concentração na faixa de trabalho entre 40 - 180  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para cada antioxidante analisado.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados utilizando as equações (1) e (2).

$$LD = 3,3 s/b \quad \text{Equação (1)}$$

em que: s = desvio padrão da resposta do branco

b = coeficiente angular da curva analítica

$$LD = 10 s/b \quad \text{Equação (2)}$$

em que: s = desvio padrão da resposta do branco

b = coeficiente angular da curva analítica

\*Nota: O desvio padrão utilizado nas equações (1) e (2) foi o desvio padrão amostral, aplicado para um conjunto pequeno de dados.

A precisão é medida sob condições de repetitividade ou sob condições de reprodutibilidade e expressa na forma de coeficiente de variação – CV (%) e/ou estimativa do desvio padrão relativo (DPR) expresso em percentagem (%), neste trabalho a precisão

foi avaliada através da repetitividade dos experimentos, de acordo com a equação (3) descrita abaixo:

$$DPR (\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

em que: DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

A exatidão do método proposto foi avaliada a partir de ensaios de recuperação que proporcionou estimar resultados através da comparação da concentração do analito com amostra fortificada, não fortificada e utilizou-se a equação (4) descrita abaixo:

$$\text{Recuperação} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

em que: C<sub>1</sub> = concentração do analito na amostra fortificada

C<sub>2</sub> = Concentração do analito na amostra não fortificada

C<sub>3</sub> = Concentração do analito adicionado a amostra fortificada



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO NO DETECTOR UV-VIS

Para desenvolvimento do método analítico, primeiramente realizou-se um levantamento na literatura em busca de melhores condições cromatográficas para realização do método. Para avaliação de antioxidantes em amostras de biodiesel verificou-se a possibilidade da utilização da amostra sem necessidade de pré-tratamento, logo, a amostra de biodiesel foi preparada apenas com sua diluição em metanol 99,8% HPLC gradiente (Êxodo Científica), primeiramente na concentração de  $1000,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  denominada de solução estoque e a partir desta preparada mais duas soluções estoques (1 e 2) nas concentrações de  $50,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , para que posteriormente no início das análises fosse possível a preparação das soluções trabalho juntamente com a adição dos padrões de antioxidantes em sete níveis de concentração na faixa entre  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  -  $180 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV-VIS SPD-20A (DAD) e detector eletroquímico Década II da Antec Scientific, com coluna de fase reversa Zorbax SB – C18 (150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro externo e partícula de 5  $\mu\text{m}$  respectivamente da Agilent Technologies). A otimização dos padrões de antioxidantes no detector UV-vis, no qual a eluição foi monitorada na porção ultravioleta do espectro e as quantificações foram realizadas com um detector UV-Vis operando a uma faixa de 190 - 400 nm. Utilizaram-se soluções intermediárias dos três padrões de antioxidantes para análise da eluição dos mesmos e da separação cromatográfica, em diversas proporções da fase móvel: MeOH: H<sub>2</sub>O, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 (v/v).

A separação cromatográfica de uma mistura é baseada nas diferenças das velocidades nas quais são transportados os analitos através da fase estacionária por uma fase móvel líquida.

Primeiramente foi avaliado qual o comprimento de onda necessário para detectar os três padrões de antioxidantes, segundo (ANDRADE, A. G. F., et al, 2015; FREITAS, P. V., 2018; CASAGRANDE, 2017), o Butil-Hidroxianisol (BHA) era detectado em um comprimento de onda de 280 nm, o Terc-Butil-Hidroquinona (TBHQ) em 290 nm e o Galato de Propila (PG) em 280 nm. Tendo em vista isto, avaliou-se utilizando o detector UV-Vis em uma faixa de 190 - 400 nm para comprovar o comprimento de onda mais adequado para evitar interferências, maior sensibilidade e estabilidade do sinal da linha de base, e foi possível

detectar os três padrões de antioxidantes sintéticos simultaneamente com o comprimento de onda em 280 nm.

Foi realizada uma avaliação da composição da fase móvel com intuito de analisar qual a melhor proporção que os padrões de antioxidantes eluíam apresentando melhores resultados. Na figura 16 pode-se visualizar os cromatogramas dos padrões de antioxidantes em diferentes proporções, utilizando o modo de eluição isocrática e obteve-se a seguinte ordem de eluição: (1) Galato de Propila (PG), (2) Terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e (3) Butil-Hidroxianisol (BHA).

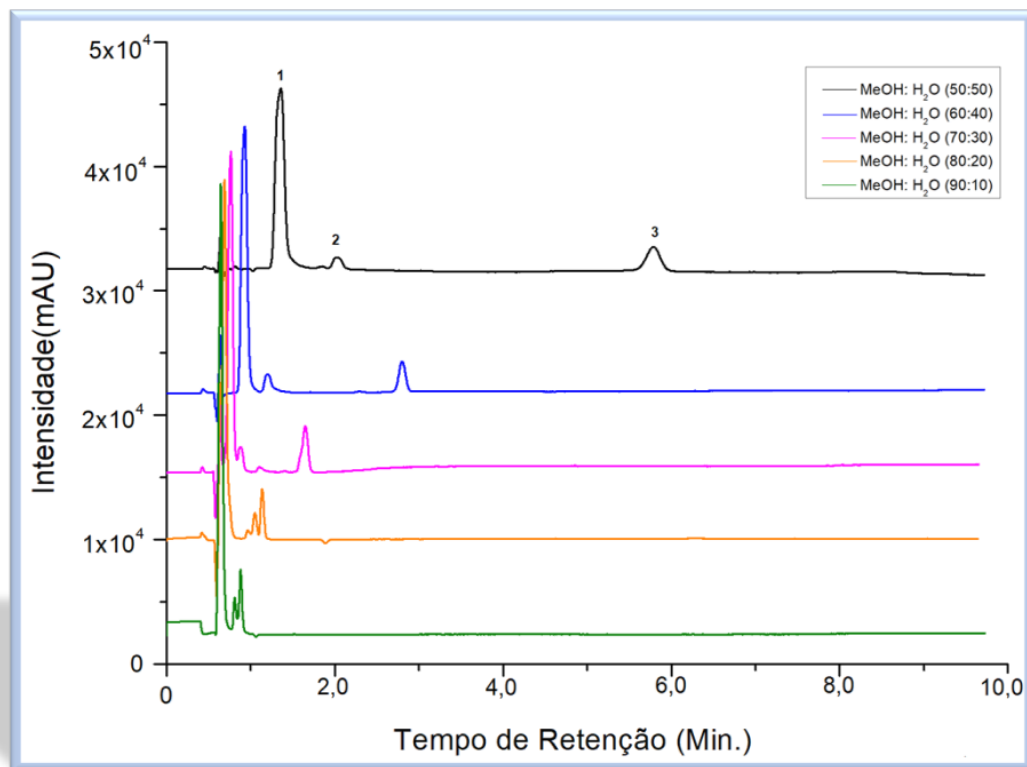


Figura 16. Cromatogramas dos padrões de antioxidantes em diferentes proporções de fase móvel. Ordem da eluição: (1) Galato de Propila (PG), (2) Terc-Butil-Hidroquinona (TBHQ) e (3) Butil-Hidroxianisol (BHA). Condições cromatográficas: comprimento de onda monitorado 280nm, coluna Zorbax SB – C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm), temperatura do forno = 40°C, volume de injeção = 20 µL e Fluxo da fase móvel = 1 mL. min<sup>-1</sup>.

Na cromatografia, alguns parâmetros cromatográficas são verificados para estimar se as condições definidas para as separações cromatográficas proporcionam resultados confiáveis e se estão de acordo com valores recomendados.

O fator de retenção é a relação da velocidade com a qual o analito migra através da coluna, pode ser determinado pela razão entre o tempo em que o analito fica retido na

fase estacionária e o tempo em que escoar na coluna na fase móvel, conforme a equação (5) abaixo.

$$k = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad \text{Equação (5)}$$

em que:  $t_R$  = tempo de retenção do analito

$t_m$  = tempo morto, ou seja, o tempo no qual a fase móvel escoar por toda a coluna

Na cromatografia os valores ideais do fator de retenção ( $k$ ) estão no intervalo  $1 \leq k \leq 10$ , sendo também aceito para análises de múltiplos componentes  $0,5 \leq k \leq 20$ . Valores baixos de  $k$  proporcionam pouca interação do analito com a fase estacionária, valores muito altos de  $k$  podem possibilitar alargamento dos picos e maior tempo de análise (COLLINS et al., 2017).

Realizou-se o cálculo dos valores de retenção dos padrões de antioxidantes utilizando a equação (5) e analisou-se a relação destes resultados com a fase móvel. A partir da figura 17 observam-se os resultados dos cromatogramas e avaliou-se a melhor proporção para obtenção da separação cromatográfica dos padrões de antioxidantes utilizando o MeOH:H<sub>2</sub>O como fase móvel.

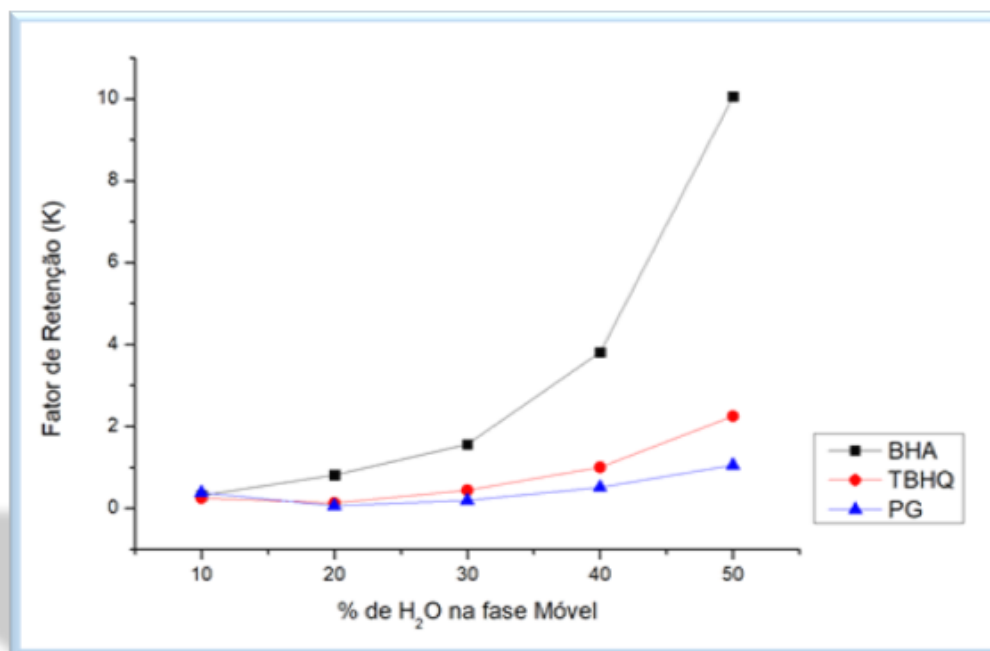


Figura 17. Fator de retenção ( $k$ ) *versus* a concentração da fase móvel

A partir dos resultados de tempos de retenção definiu-se que a proporção de fase móvel utilizada neste trabalho seria: fase móvel A composta de Água Deionizada em sistema Osmose Reversa (Osmose Reversa-Purify) acidificada com 0,1% de Ácido Acético (Synth) (v/v) e a fase móvel B composta de Metanol 99,8% HPLC Gradiente (Êxodo Científica), na proporção 40:60% (v/v).

Também foi analisado o parâmetro da resolução cromatográfica ( $R_s$ ), definida como a medida da separação de dois picos adjacentes, ou seja, distância de duas bandas sendo uma em relação a outra em comparação com suas larguras. A resolução cromatográfica pode ser calculada a partir da equação (6):

$$R_s = \frac{2[(tR_B) - (tR_A)]}{W_A + W_B} \quad \text{Equação (6)}$$

em que:  $tR_A$  = tempo de retenção dos pico adjacente A

$tR_B$  = tempo de retenção do pico adjacente B

$W_A$  = largura do pico A na sua base, em unidades de tempo

$W_B$  = largura do pico B na sua base, em unidades de tempo

Como avaliação da resolução cromatográfica: resultados de  $R_s = 1$  definem que os picos foram separados razoavelmente,  $R_s > 1,25$  indicam uma separação de 100% para picos gaussianos e  $R_s = 1,5$  ocorreu a separação dos picos de forma satisfatória para análises quantitativas.

Outros parâmetros calculados para avaliar a eficiência da coluna cromatográfica foi o número de pratos teóricos (N) e o fator de separação ( $\alpha$ ). O fator de separação ou também conhecido como seletividade entre dois compostos que são diretamente dependentes da retenção de cada componente na fase estacionária, pode ser calculado a partir da equação (7):

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{tR_B}{tR_A} \quad \text{Equação (7)}$$

em que:  $K_B$  = é a constante de distribuição para a espécie mais fortemente retida B

$K_A$  = a constante para a espécie menos retida A

$tR_A$  = tempo de retenção ajustado para o componente A

$tR_B$  = tempo de retenção ajustado para o componente B

Resultados de fator de separação  $\alpha = 1$ , informam que não há diferença entre os dois compostos e os mesmos não podem ser separados, resultados de  $\alpha > 1$ , indicam a separação dos compostos, mas não comprovam picos totalmente separados, ou seja, a boa separação ocorre apenas se os picos forem estreitos (COLLINS et al., 2017).

O número de pratos teóricos fornece informações a respeito da eficiência da coluna utilizada no método e pode ser calculada a partir da equação (8), bem como altura equivalente de um prato (H), representado pela equação (9) (COLLINS et al., 2017).

$$N = \left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2 \times 16 \quad \text{Equação (8)}$$

em que:  $t_R$  = tempo de retenção

$W_b$  = largura do pico B na sua base, em unidades de tempo

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Equação (9)}$$

em que: L = comprimento da coluna

N = número de pratos teóricos

Os resultados dos parâmetros calculados para avaliação da eficiência da coluna e comprovação da otimização do método estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Resultados dos parâmetros de eficiência da coluna.

Antioxidantes	tR	N	H	Rs	$\alpha$
<b>PG</b>	2,4	2304	65,10	4,00	1,33
<b>TBHQ</b>	3,2	4096	36,62	15,67	2,47
<b>BHA</b>	7,9	24964	6,01	18,33	5,50

Os três padrões de antioxidantes apresentaram números de pratos teóricos maiores que 2000, ou seja, resultados que comprovam a separação cromatográfica, bem como seus resultados de fator de separação ( $\alpha$ ) maiores que 1,0 indicando separação dos compostos.

A partir da figura 18 pode-se observar a separação dos três antioxidantes sintéticos: PG, TBHQ, BHA na matriz do biodiesel nas concentrações na faixa estudada entre 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  - 180  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

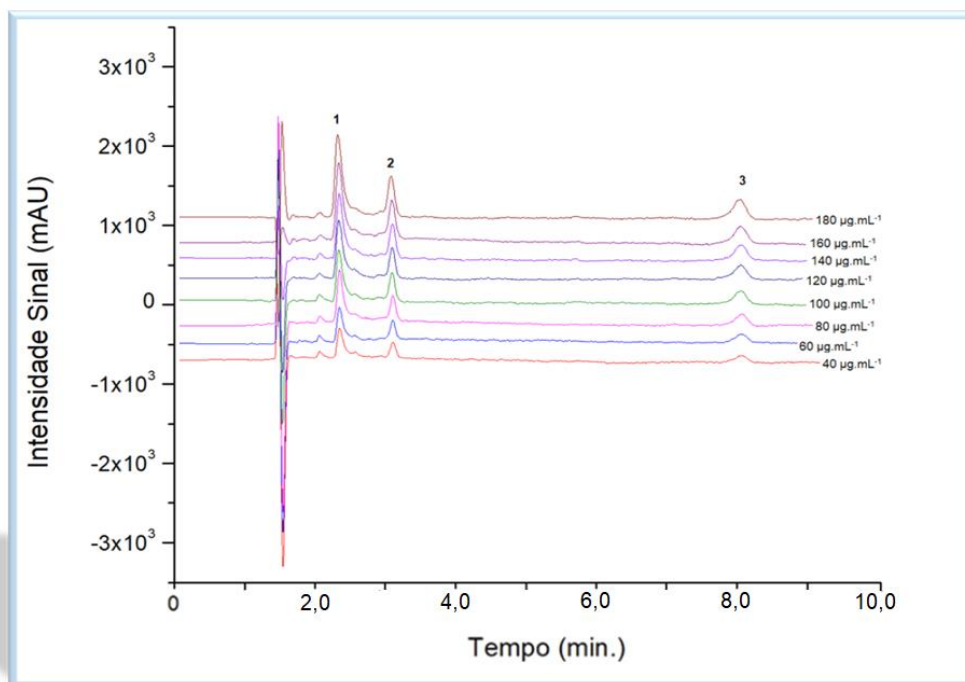


Figura 18. Cromatogramas dos antioxidantes sintéticos nas concentrações analisadas no detector UV-Vis. Sendo a eluição da ordem: (1) PG, (2)TBHQ e (3) BHA.

## 6.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO NO DETECTOR ELETROQUÍMICO

Após definição da proporção da fase móvel e demais parâmetros para o método cromatográfico, iniciou-se a otimização dos padrões de antioxidantes PG, TBHQ, BHA no detector eletroquímico Década II.

Primeiramente foi avaliada a oxidação eletroquímica dos três padrões de antioxidantes pela técnica de cronoamperometria convencional, que consiste da aplicação de um potencial constante ao longo de toda a análise utilizando uma célula eletroquímica. Neste trabalho utilizou-se uma célula eletroquímica de fluxo composta por três eletrodos, sendo o eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, o eletrodo padrão de referência de hidrogênio e o eletrodo auxiliar de fio de aço inoxidável. A solução eletrolítica foi a própria fase móvel: MeOH:H<sub>2</sub>O com pH = 3,71, sendo a fase móvel A acidificada com ácido acético 0,1%.

A acidificação da fase móvel com ácido acético foi utilizada com o intuito de favorecer melhores resultados das amostras de padrões de antioxidantes sintéticos, pois a acidificação da amostra auxilia os grupos ácidos a se manterem em suas formas não ionizadas e assim na obtenção de uma boa sensibilidade na análise, resolução e

proporciona picos mais intensos. O pH em meio ácido também favorece na aplicação do potencial para a reação de oxidação no detector eletroquímico como solução de eletrólito.

No detector eletroquímico Década II é possível definir um potencial fixo (único) para toda a análise e também um valor máximo de corrente, tendo em vista isto, foram otimizadas condições do potencial e a corrente em busca de melhores resultados para o comportamento eletroquímico dos três antioxidantes simultaneamente. Primeiramente buscou-se na literatura os valores de potenciais de oxidação adequados para detecção de cada padrão de antioxidante sintético, sendo estes:  $E_c = +0,7$  V para o padrão PG,  $+0,6$  V para o padrão TBHQ e  $+0,7$  V para o padrão BHA (ANDRADE, A. G. F., et al, 2015; CASAGRANDE, 2017; FREITAS, P. V., 2018).

Avaliaram-se as seguintes faixas de potencial:  $+0,4$  V,  $+0,6$  V,  $+0,8$  V e  $+1,0$  V e nas seguintes faixas de corrente: 20 nA, 50 nA e 100 nA. Observa-se na figura 19 os cromatogramas dos padrões de antioxidantes em diferentes potenciais aplicados, utilizando o modo de eluição isocrático.

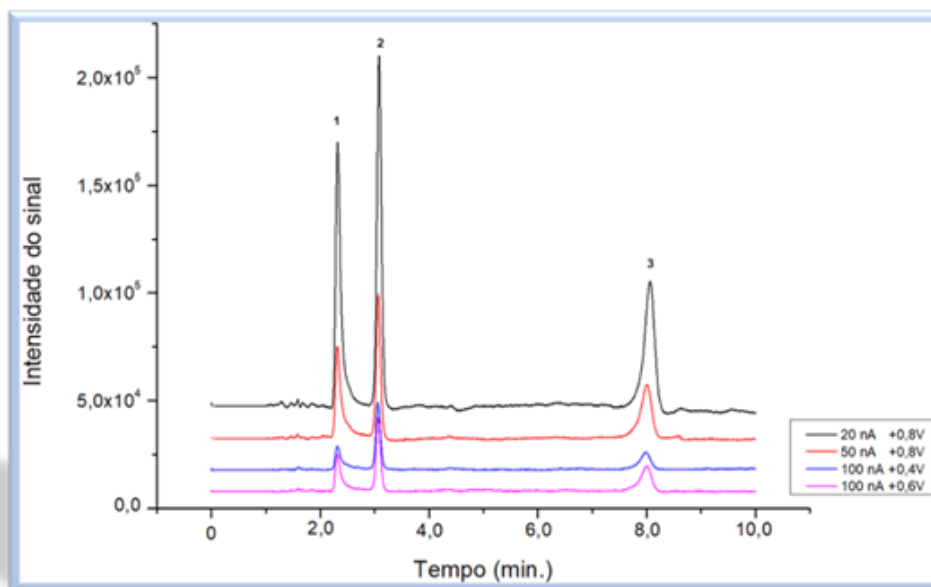


Figura 19. Cromatograma da otimização dos padrões de antioxidantes utilizando o detector eletroquímico Década II em diferentes potenciais de oxidação:  $+0,4$  V,  $+0,6$  V,  $+0,8$  V e corrente estabelecida em: 20 nA, 50 nA, 100 nA. Sendo (1) Galato de Propila (PG), (2) Terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e (3) Butil-Hidroxianisol (BHA).

Foi possível detectar os três antioxidantes sintéticos PG, TBHQ, BHA simultaneamente aplicando quase todas as condições avaliadas, conforme a figura 19. As condições analisadas com 20 nA em  $+0,4$  V,  $+0,6$  V, 50 nA em  $+0,4$  V e 50 nA em  $+0,6$  V não foi

possível a detecção de todos os três antioxidantes sintéticos simultaneamente, provavelmente devido aos valores destes potenciais não serem altos o suficiente para fornecerem energia necessária para a ocorrência da oxidação de todos os antioxidantes.

Após otimização, definiu-se trabalhar com o potencial de +0,8V e 50 nA, pois foram as melhores condições que proporcionavam resultados satisfatórios sem risco de danificar a célula eletroquímica e eletrodos tendo em vista que os limites dos potenciais informados na tabela 01 para reação de oxidação utilizando eletrodo de carbono vítreo é de +1,3 V.

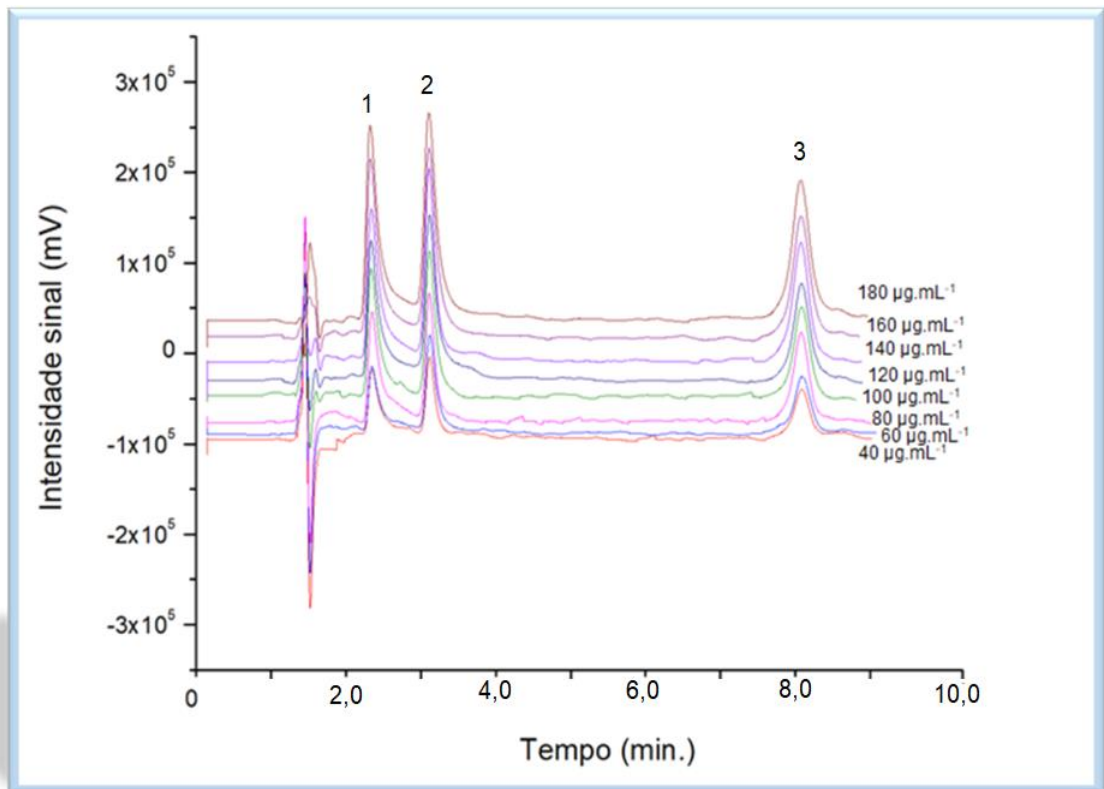


Figura 20. Cromatogramas dos antioxidantes sintéticos nas concentrações analisadas no detector Eletroquímico. Sendo a eluição da ordem: (1) PG, (2) TBHQ e (3) BHA.

A partir da figura 20 pode-se observar a separação e detecção simultânea dos três antioxidantes sintéticos: PG, TBHQ, BHA na matriz do biodiesel nas concentrações na faixa estudada entre  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  -  $180 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pelo detector eletroquímico aplicando potencial +0,8V e 50,0 nA durante um tempo de análise de 10 minutos. Pode-se observar a boa separação dos antioxidantes sem interferência nos mesmos tempos de retenção.



### 6.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A separação simultânea dos antioxidantes sintéticos em biodiesel utilizando detecção UV-Vis e eletroquímica foi satisfatória, cada pico com tempo de retenção bem definido. O método proposto para detecção e quantificação de antioxidantes sintéticos simultaneamente em amostra de biodiesel foi validado seguindo recomendações do Inmetro – DOQ-CGCRE-008 rev. 09, no qual foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão.

#### 6.3.1 Seletividade

A combinação da cromatografia líquida de alta eficiência com a detecção eletroquímica proporcionou a obtenção de resultados satisfatórios de seletividade. Realizou-se uma análise do branco do biodiesel, ou seja, puro, sem presença de antioxidantes sintéticos, no qual foi possível observar a ausência de interferentes no sinal da matriz no mesmo tempo de retenção dos antioxidantes sintéticos, demonstrando assim a detecção e possibilidade de quantificação.

A figura 21 apresenta a matriz do branco de biodiesel nas condições otimizadas do método: com fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O+Ácido Acético 0,1% na proporção de 60:40, coluna Zorbax Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), temperatura do forno 40°C, volume de injeção= 13 µL e o fluxo da fase móvel de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

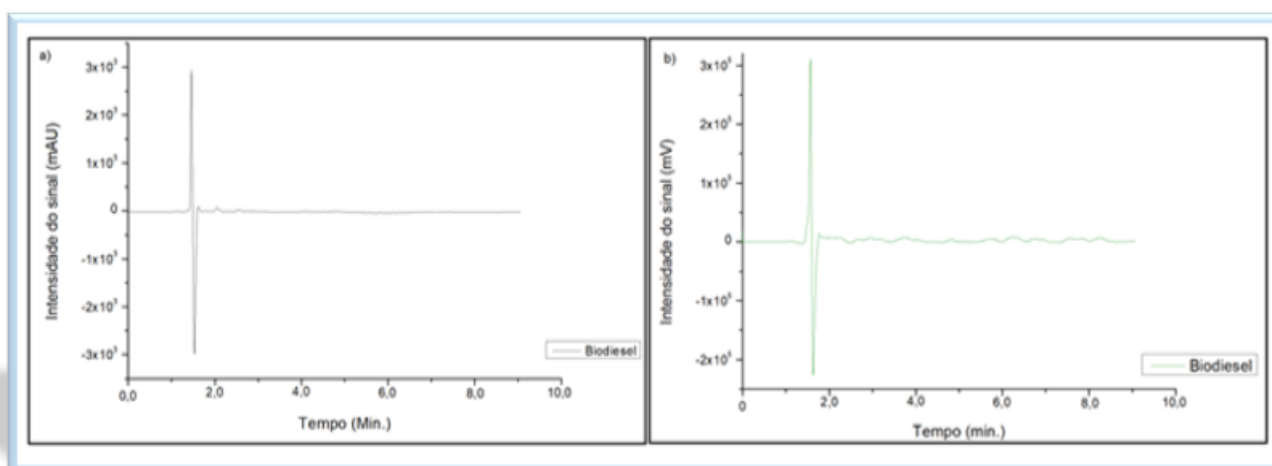


Figura 21. Cromatogramas do branco de biodiesel na ausência dos antioxidantes sintéticos. a) Branco do biodiesel no detector UV-Vis, com comprimento de onda 280 nm; b) Branco do biodiesel no detector eletroquímico, potencial +0,8V.

### 6.3.2 Linearidade, Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

A linearidade foi verificada pelo método dos mínimos quadrados (MMQ), através da construção de curvas analíticas a partir de soluções do biodiesel diluído em metanol 99,8% HPLC Gradiente (Êxodo Científica), com adição dos padrões de antioxidantes sintéticos PG, TBHQ e BHA em concentrações na faixa entre  $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  –  $180,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  nas condições definidas a partir da otimização, sendo cada nível realizado em triplicata. Verificou-se através das curvas de analíticas nas figuras 22, 23 e 24 a linearidade das concentrações *versus* a resposta do detector UV-Vis SPD-20A (DAD), ou seja, são diretamente proporcionais para os três antioxidantes. Todos os três padrões apresentaram coeficiente de correlação linear  $\geq 0,99$ , estando assim acima do estabelecido pelo Inmetro – DOQ-CGCRE-008 rev. 09 conforme apresentado na tabela 04.

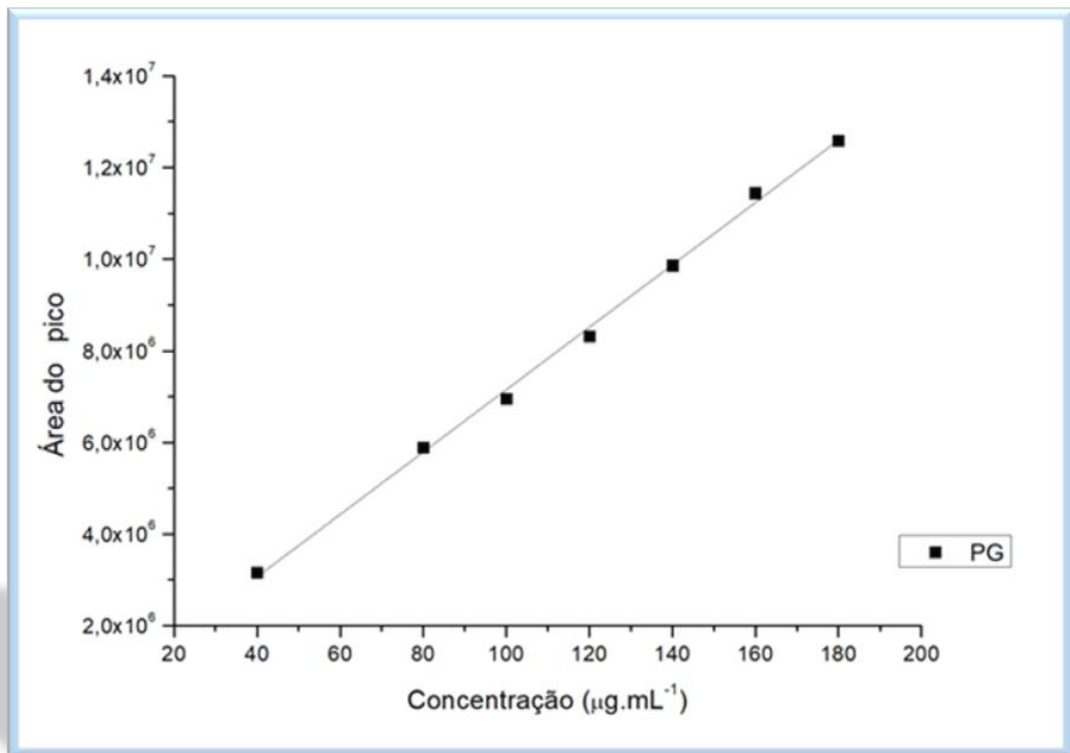


Figura 22. Curva analítica do padrão de antioxidante sintético PG em detector UV-Vis.

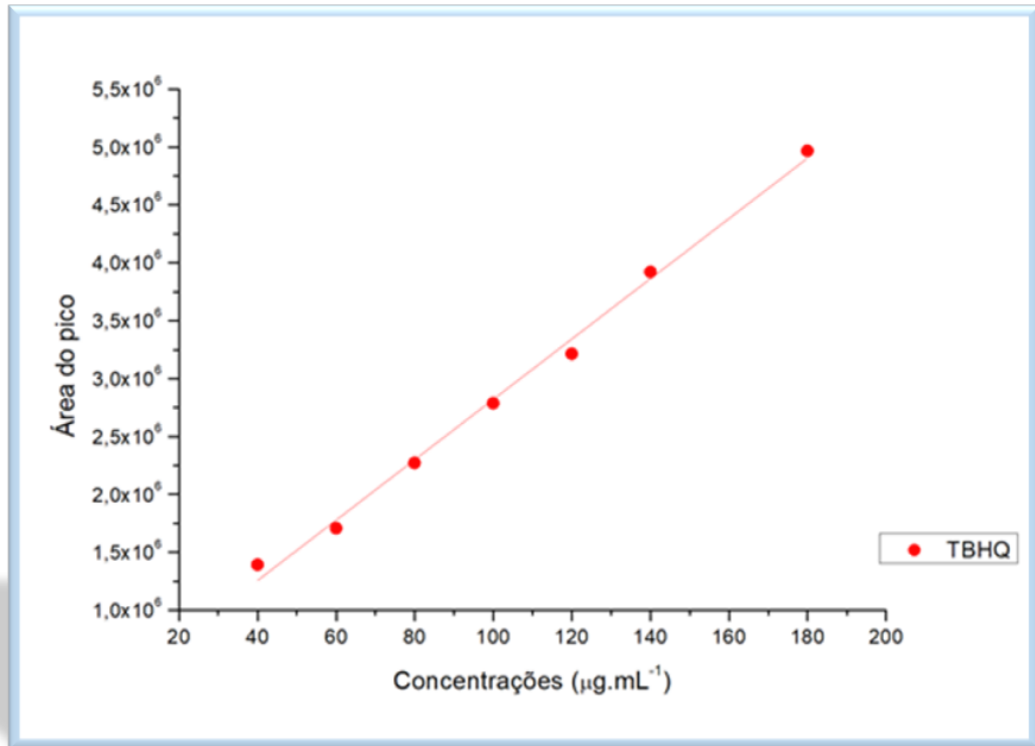


Figura 23. Curva analítica do padrão de antioxidante sintético TBHQ em detector UV-Vis.

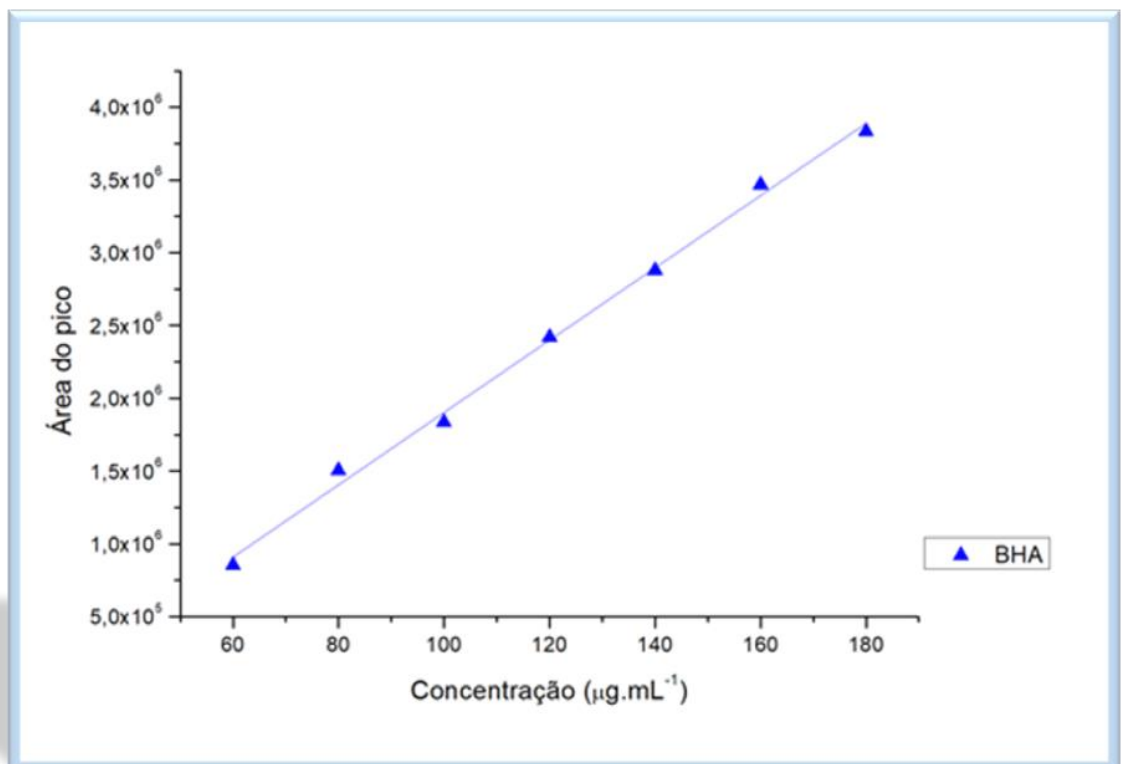


Figura 24. Curva analítica do padrão de antioxidante sintético BHA em detector UV-Vis.

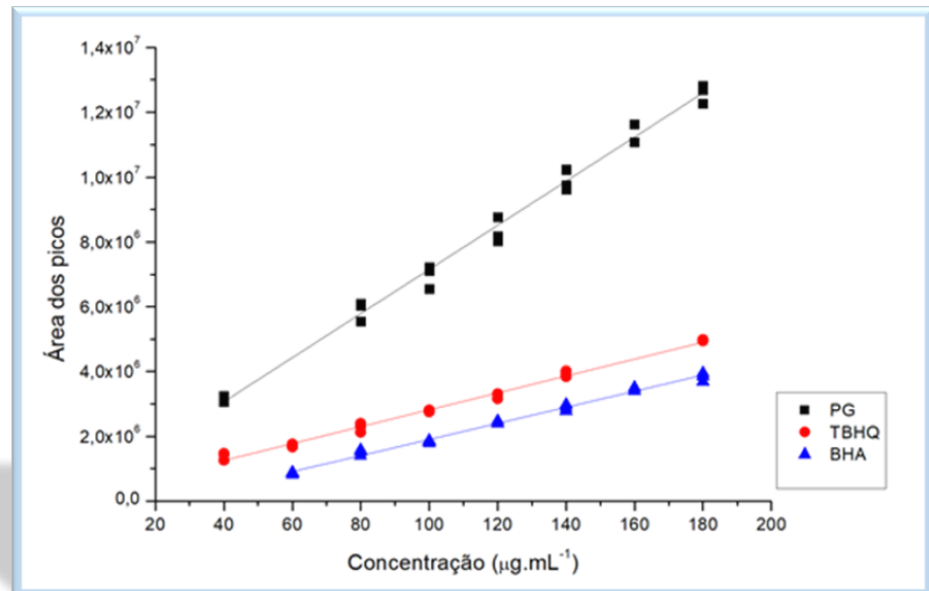


Figura 25. Curva analítica dos padrões de antioxidantes sintéticos PG, TBHQ e BHA em detector UV-Vis.

Na curva analítica apresentada na figura 25, observa-se também a linearidade satisfatória para a determinação simultânea dos três antioxidantes em detector UV-Vis SPD-20A (DAD): Proporcionando vantagem no método simultâneo devido à economia de reagentes e tempo da realização das análises.

A tabela 4 apresenta os resultados dos limites de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), intercepto (coeficiente linear) e coeficiente de correlação ( $r$ ) de cada antioxidante sintético, que foram calculados a partir das curvas analíticas de cada antioxidante.

Tabela 4. Parâmetros das curvas analíticas dos antioxidantes sintéticos PG, TBHQ e BHA em detector UV-Vis.

Antioxidantes	PG	TBHQ	BHA
<b>Faixa de trabalho (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	40 - 180	40 - 180	40 - 180
<b>Intercepto</b>	343091	213733	-581489
<b>r</b>	0,9955	0,9957	0,9959
<b>LD (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	8,1618	7,1927	7,9215
<b>LQ (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	27,20	23,95	26,38

A técnica de cromatografia permitiu detectar os três padrões de antioxidantes sintéticos individualmente e simultaneamente utilizando o detector eletroquímico DECADA II, a partir das curvas analíticas apresentadas nas figuras 26, 27 e 28. Pode - se observar cada padrão de antioxidante sintético com uma boa linearidade. Tais curvas foram analisadas empregando diluição do biodiesel em metanol com os antioxidantes sintéticos PG, TBHQ, e BHA nas faixa de concentrações entre 40 - 180  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

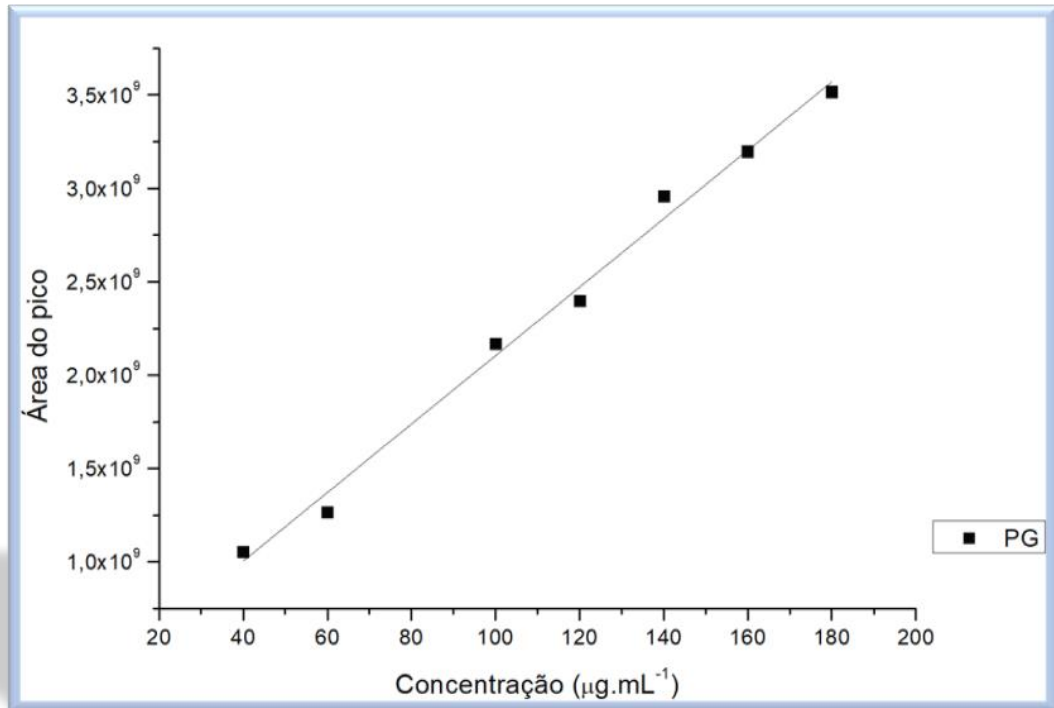


Figura 26. Curva analítica do padrão de antioxidante sintético PG em detector eletroquímico.

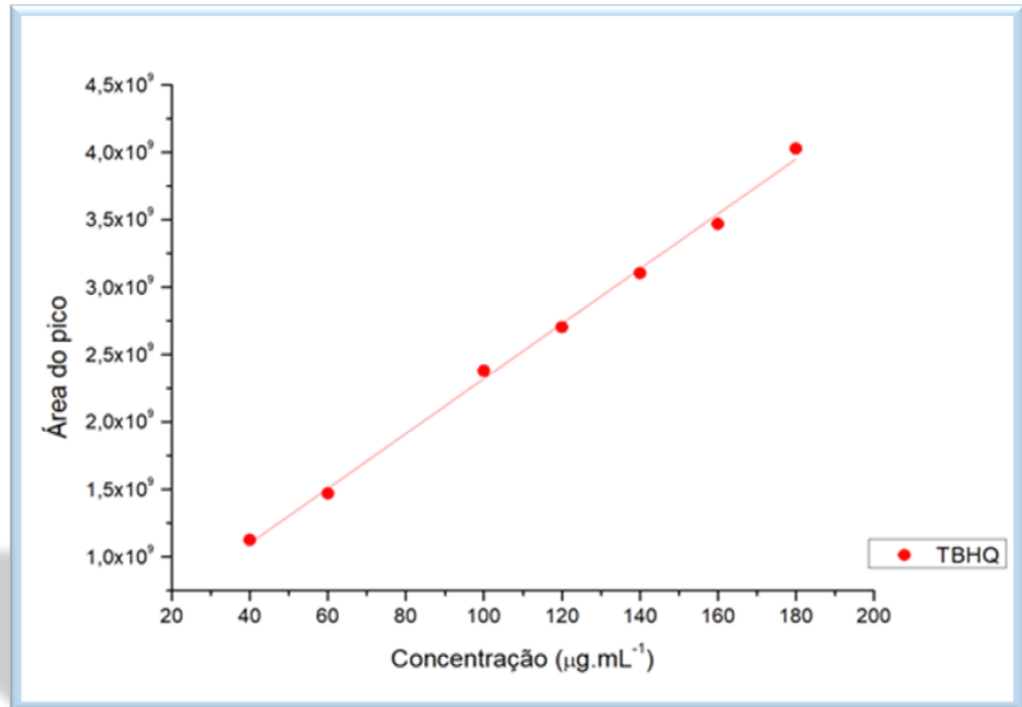


Figura 27. Curva analítica do padrão de antioxidante sintético TBHQ em detector eletroquímico.

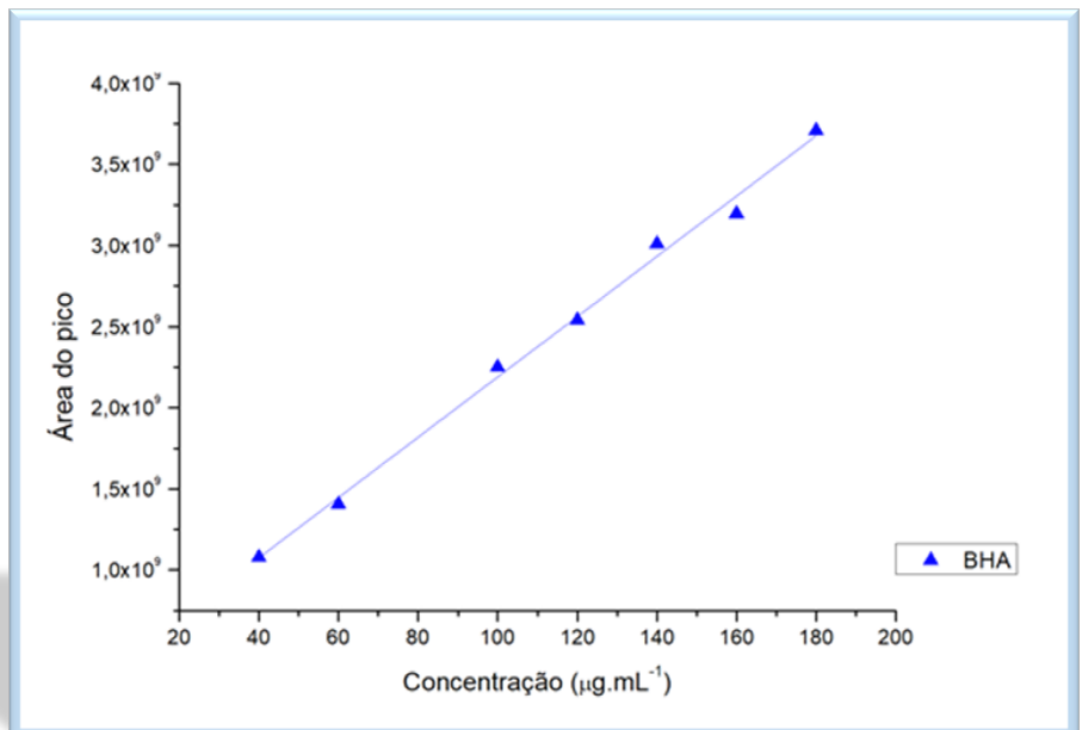


Figura 28. Curva analítica do padrão de antioxidante sintético BHA em detector eletroquímico.

Na curva analítica apresentada na figura 29, também é possível observar uma boa linearidade para a determinação simultânea dos três antioxidantes em detector eletroquímico aplicando um potencial fixo de 0,8V e corrente de 50 nA.

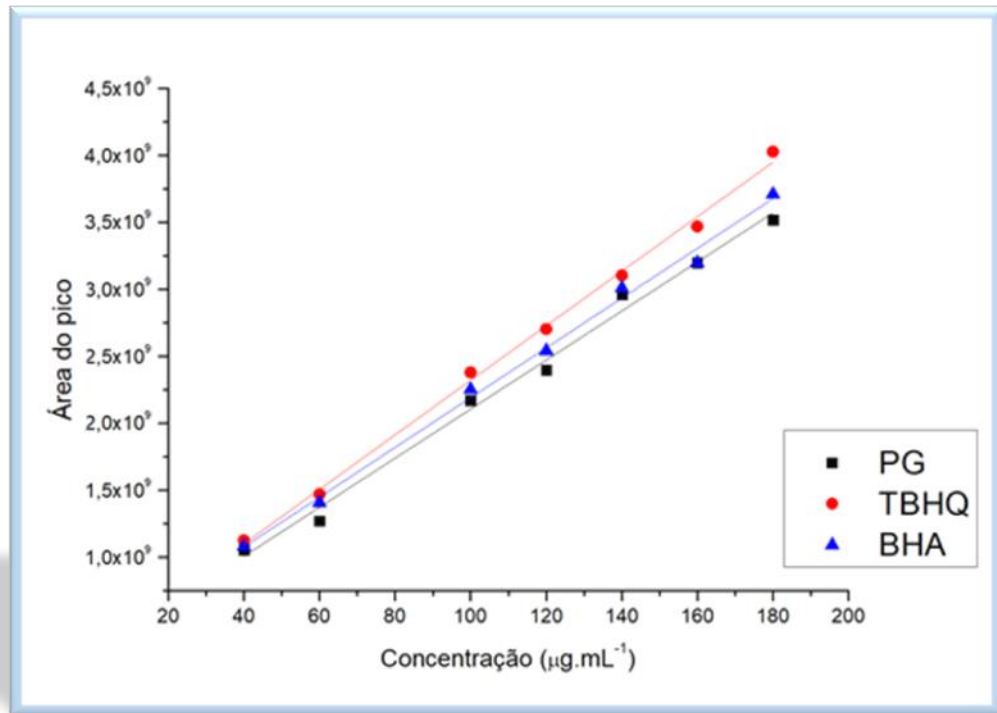


Figura 29. Curva analítica dos padrões de antioxidantes sintéticos PG, TBHQ e BHA em detector eletroquímico.

O método analítico proposto foi validado com o intuito da determinação simultânea de antioxidantes PG, TBHQ, BHA e obteve-se resultados satisfatórios, tendo como principal vantagem uma determinação direta de antioxidantes sintéticos em biodiesel simultaneamente utilizando detecção eletroquímica, sem a necessidade de pré-tratamento da amostra.

Os três padrões de antioxidantes sintéticos apresentaram resultados satisfatórios para os coeficientes de correlação linear sendo  $\geq 0,99$ , estando assim acima do estabelecido pelo Inmetro – DOQ-CGCRE-008 rev. 09 conforme apresentado na tabela 04.

A tabela 5 apresenta os resultados dos limites de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), intercepto (coeficiente linear) e coeficiente de correlação ( $r$ ) de cada antioxidante sintético referente ao detector eletroquímico, que foram calculados a partir das curvas analíticas de cada antioxidante sintético. O limite de detecção e quantificação foram calculados utilizando as equações (6) e (7) descritos anteriormente.

Tabela 5. Parâmetros das curvas analíticas dos antioxidantes sintéticos PG, TBHQ e BHA em detector eletroquímico.

Antioxidantes	PG	TBHQ	BHA
<b>Faixa de trabalho (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	40 - 180	40 - 180	40 - 180
<b>Intercepto</b>	272512776	283308647	331807870
<b>r</b>	0,9956	0,9962	0,9954
<b>LD (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	7,9565	7,4668	8,1823
<b>LQ (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	26,50	24,86	27,25

A oxidação dos antioxidantes sintéticos foi analisada e validada pela aplicação de potencial fixo ao longo da análise, em uma célula eletroquímica empregando o carbono vítreo sem modificação como eletrodo de trabalho.

Os resultados mostraram picos de oxidação bem definidos dos três antioxidantes sintéticos aplicando-se um potencial fixo de +0,8V e corrente de 50 nA durante um tempo de 10 minutos de análise. Ao aplicar o potencial constante, o eletrodo padrão de referência de hidrogênio mantinha o potencial desejado, enquanto o eletrodo auxiliar de fio de aço inoxidável detectava a corrente gerada do processo redox.

Analisou-se a homocedasticidade através de gráficos de resíduos para avaliar a dispersão dos dados obtidos e assim a igualdade das variâncias, estas últimas que foram verificadas com auxílio do método estatístico análise de variância (ANOVA) calculado pelo Excel.

A homocedasticidade é uma propriedade do modelo de regressão linear que indica uma variação constante (e/ou menor) na estimativa de erros, permitindo obtenção de modelos mais confiáveis.

Os gráficos de resíduos referentes aos resultados das curvas analíticas do detector UV-Vis podem ser visualizados nas figuras 30, 31 e 32.



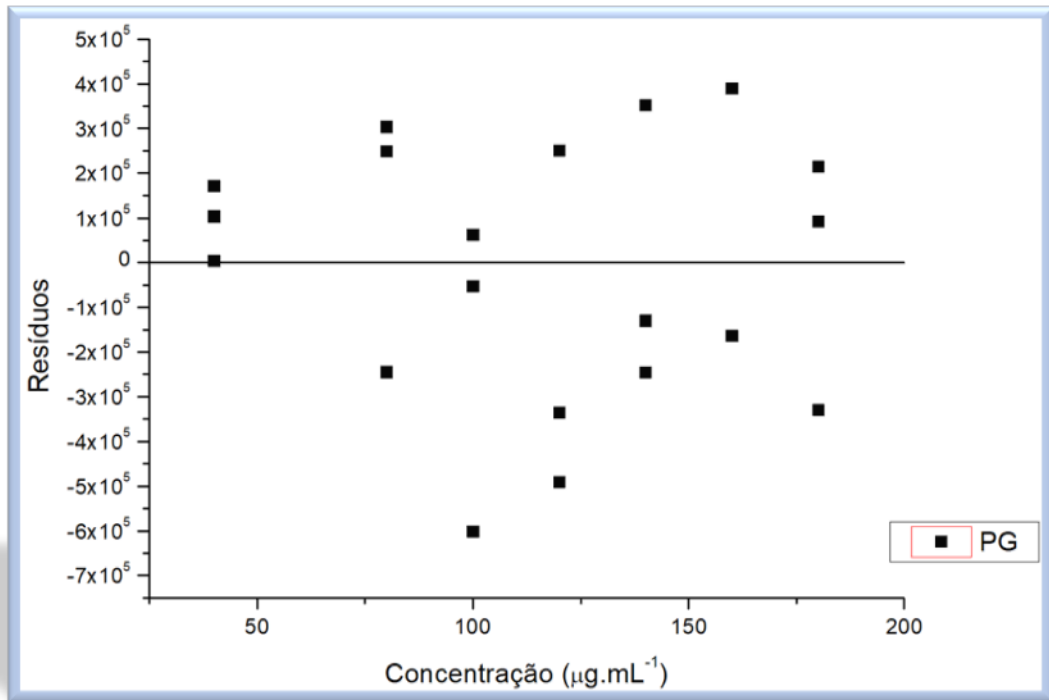


Figura 30. Resíduos do padrão de antioxidante sintéticos PG em detector UV-Vis.

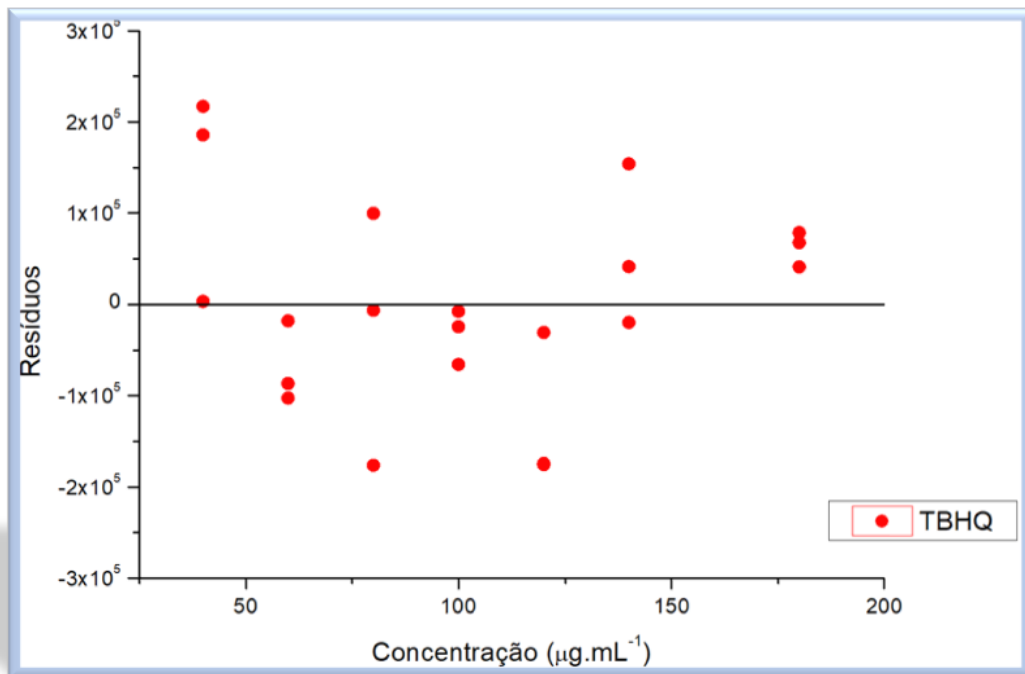


Figura 31. Resíduos do padrão de antioxidante sintéticos TBHQ em detector UV-Vis.

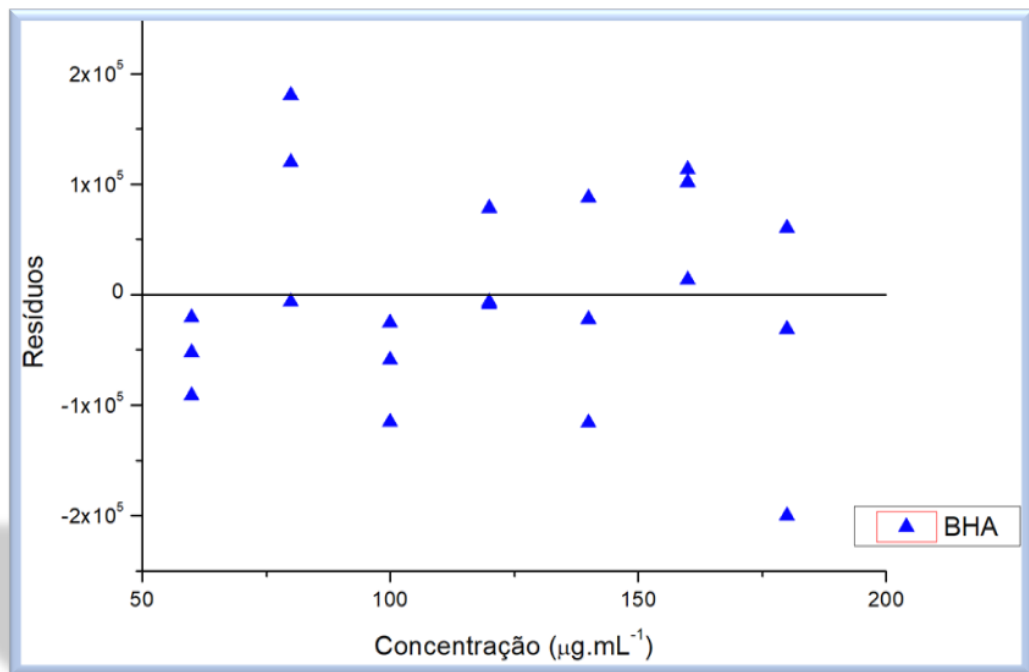


Figura 32. Resíduos do padrão de antioxidante sintéticos BHA em detector UV-Vis

Pode-se observar que não houve valores discrepantes em nenhuma situação apresentada, ou seja, não houve diferença significativa de índice de falta de ajuste para os resultados obtidos nas análises dos antioxidantes sintéticos no detector UV-Vis.

Por meio do método estatístico ANOVA foi possível verificar a presença ou não de diferença significativa entre as médias dos resultados obtidos nas curvas analíticas. A ANOVA é capaz de detectar (caso exista) diferença em diversas médias de populações pela comparação das variâncias entre grupos. Segue o princípio de distribuição F de Fisher-Snedecor em que a distribuição F refere-se a um modelo de amostragem contínua, obtido pela razão entre duas variáveis aleatórias independentes com distribuição normal e cada uma dividida por seus graus de liberdade. A distribuição F é assimétrica à direita e descrita pelos graus de liberdade do numerador e denominador, os resultados obtidos são comparados com o F crítico tabelado que expressa a distribuição das abcissas de um gráfico de distribuição F.

Os resultados estatísticos obtidos pela ANOVA para os três antioxidantes sintéticos: PG, TBHQ e BHA no detector UV-Vis estão descritos na tabela 6, 7 e 8 respectivamente.

Tabela 6. Resultados dos dados da ANOVA para o antioxidante PG em detector UV-Vis.

<b>PG – Detector UV-Vis</b>					
Fonte de Variação	Entre os grupos	Dentro dos grupos	Erro	Total	F tabelado
Soma dos quadrados (SQ)	0,8252	41.917,4837	284,7931	42.203,1020	3,8853
Graus de liberdade (gl)	2	6	12	20	2,9961
Quadrado médio (QM)	0,4126	6.986,2473	23,7328		
F (calculado)	0,0174	294,3714			

Tabela 7. Resultados dos dados da ANOVA para o antioxidante TBHQ em detector UV-Vis.

<b>TBHQ – Detector UV-Vis</b>					
Fonte de Variação	Entre os grupos	Dentro dos grupos	Erro	Total	F tabelado
Soma dos quadrados (SQ)	17,9465	42.043,7385	131,5826	42.193,2676	3,8856
Graus de liberdade (gl)	2	6	12	20	2,9961
Quadrado médio (QM)	8,9732	7.007,2897	10,9652		
F (calculado)	0,8183	639,0469			

Tabela 8. Resultados dos dados da ANOVA para o antioxidante BHA em detector UV-Vis.

<b>BHA - Detector UV-Vis</b>					
Fonte de Variação	Entre os grupos	Dentro dos grupos	Erro	Total	F tabelado
Soma dos quadrados (SQ)	8,7370	33.730,2245	139,2686	33.878,2301	3,8853
Graus de liberdade (gl)	2	6	12	20	2,9961
Quadrado médio (QM)	4,3685	5.621,7041	11,6057		
F (calculado)	0,3764	484,3911			

Os resultados estatísticos obtidos pela ANOVA para os três antioxidantes sintéticos: PG, TBHQ e BHA no detector Eletroquímico estão descritos na tabela 9, 10 e 11 respectivamente.

Tabela 9. Resultados dos dados da ANOVA para o antioxidante PG em detector Eletroquímico.

<b>PG – Detector Eletroquímico</b>					
Fonte de Variação	Entre os grupos	Dentro dos grupos	Erro	Total	F <sub>tabelado</sub>
Soma dos quadrados (SQ)	2,4557	47.678,1260	46,6026	47.727,1843	3,8853
Graus de liberdade (gl)	2	6	12	20	2,9961
Quadrado médio (QM)	1,2278	7.946,3540	3,8835		
F <sub>(calculado)</sub>	0,3162	2.046,1556			

Tabela 10. Resultados dos dados da ANOVA para o antioxidante TBHQ em detector Eletroquímico.

<b>TBHQ – Detector Eletroquímico</b>					
Fonte de Variação	Entre os grupos	Dentro dos grupos	Erro	Total	F <sub>tabelado</sub>
Soma dos quadrados (SQ)	14,1406	47.447,8321	215,9530	47.677,9257	3,8856
Graus de liberdade (gl)	2	6	12	20,0	2,9961
Quadrado médio (QM)	7,0703	7.907,9720	17,9961		
F <sub>(calculado)</sub>	0,3929	439,4273			

Tabela 11. Resultados dos dados da ANOVA para o antioxidante BHA em detector Eletroquímico.

<b>BHA - Detector Eletroquímico</b>					
Fonte de Variação	Entre os grupos	Dentro dos grupos	Erro	Total	F <sub>tabelado</sub>
Soma dos quadrados (SQ)	86,7125	47.525,9237	138,3420	47.750,9782	3,8853
Graus de liberdade (gl)	2	6	12	20	2,9961
Quadrado médio (QM)	43,3562	7.920,9873	11,5285		
F <sub>(calculado)</sub>	3,7608	687,0788			

Os gráficos de resíduos referentes aos resultados das curvas analíticas do detector UV-Vis podem ser visualizados nas figuras 33, 34 e 35. Pode-se observar que também não houve diferença significativa de índice de falta de ajuste para os resultados obtidos nas análises dos antioxidantes sintéticos no detector eletroquímico.

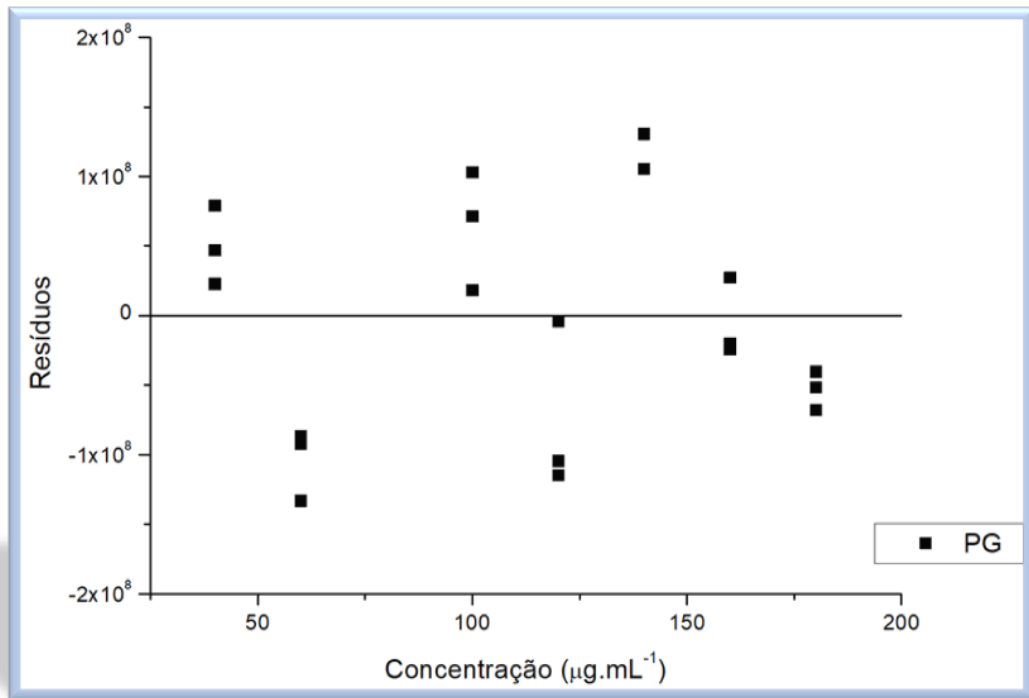


Figura 33. Resíduos do padrão de antioxidante sintéticos PG em detector Eletroquímico

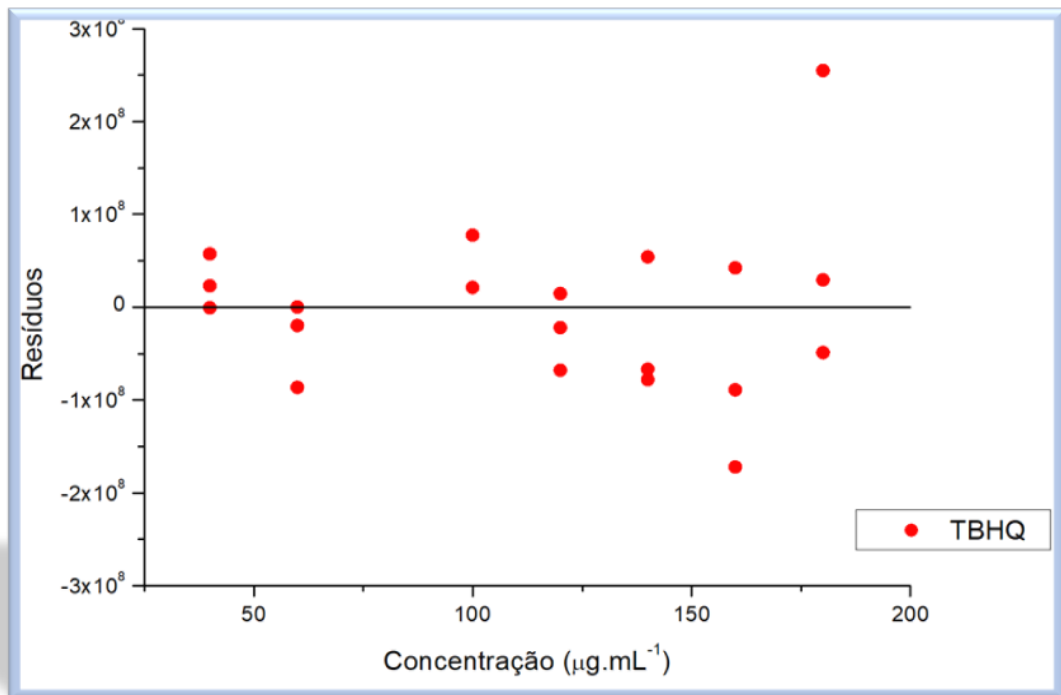


Figura 34. Resíduos do padrão de antioxidante sintéticos TBHQ em detector Eletroquímico.

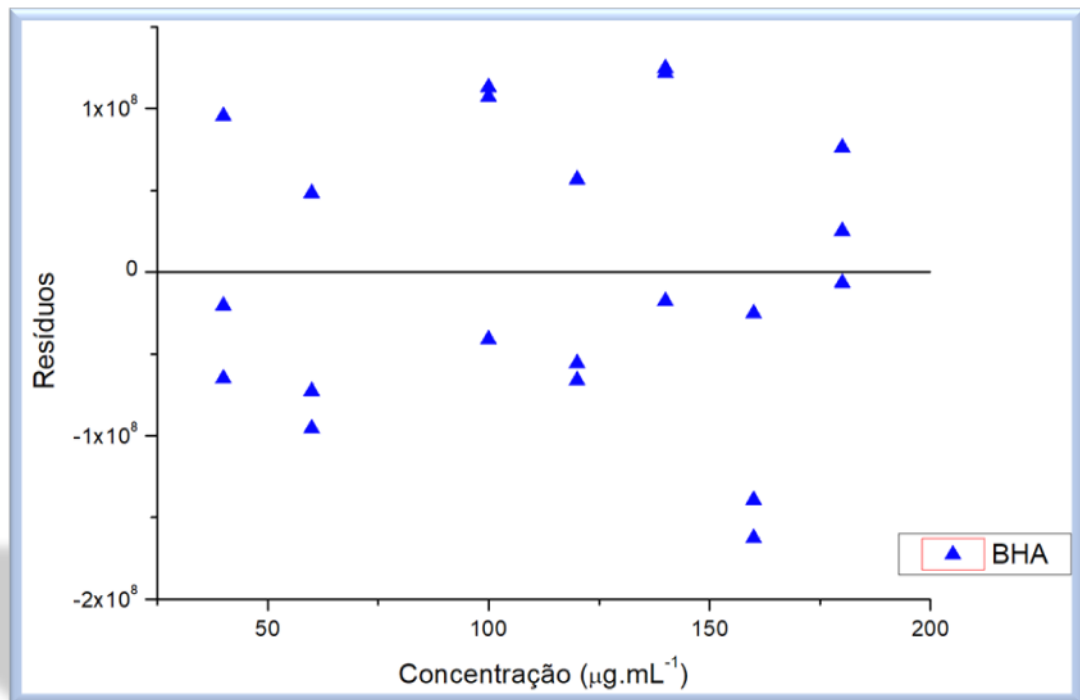


Figura 35. Resíduos do padrão de antioxidante sintéticos BHA em detector Eletroquímico.

Os resultados obtidos das curvas analíticas foram calculados pelo método estatístico do ANOVA e pode-se observar que o F calculado é menor que o F tabelado, ou seja, não existe diferença significativa entre os resultados em um nível de confiança de 95%. Para este nível e confiança, verifica-se que a regressão é significativa na descrição dos resultados, e que o modelo não apresenta falta de ajuste.

Para complementar a verificação da homocedasticidade, ou seja, a homogeneidade da variância dos resíduos proveniente das curvas analíticas foi utilizada o método de Cochran. Este método consiste no cálculo da razão da maior variância sobre a soma das variâncias, conseguindo assim o valor de F calculado e a partir disto compara-se com o F tabelado, caso o F calculado seja menor que o F tabelado compreende-se que há homogeneidade entre os resultados obtidos, mas se ocorrer o contrário e o F calculado for maior que o F tabelado, então comprova-se que as variâncias não podem ser consideradas iguais, não apresentando efeito de homocedasticidade. O F tabelado é encontrado utilizando uma tabela que expressa a distribuição F das abcissas de um gráfico de distribuição F para os níveis de concentrações estudadas em triplicata.

Tabela 12. Resultados Estatísticos do Teste Cochran para os antioxidantes sintéticos nos detectores UV-Vis e Eletroquímico.

Antioxidantes	Detector UV-Vis	Detector Eletroquímico	F <sub>tabelado</sub>
	F <sub>calculado</sub>	F <sub>calculado</sub>	
<b>PG</b>	0,102	0,245	0,722
<b>TBHQ</b>	0,013	0,023	
<b>BHA</b>	0,089	0,238	

A partir dos dados da tabela 12, verificou-se que o F calculado menor que o F tabelado, ou seja, os resultados obtidos pelo método proposto exprimem uma confiança acima de 95% e demonstram que apresentam comportamento homocedásticos.

### 6.3.3 Precisão

O estudo de repetibilidade foi realizado para avaliar a precisão da análise, no qual foi obtido através dos valores de desvio padrão relativo (DPR %), utilizando concentrações de padrões de antioxidantes adicionadas as amostras de biodiesel com intuito de avaliar a dispersão dos resultados.

Os resultados da precisão no detector UV-Vis encontram-se expressos na tabela 13.

Tabela 13. Resultados da precisão dos ensaios realizados no detector UV-Vis.

Antioxidantes	Níveis	DPR (%) intra-dia	DPR (%) inter-dia
<b>PG</b>	baixo	3,26	3,09
	médio	3,34	3,38
	alto	2,33	3,90
<b>TBHQ</b>	baixo	3,01	3,05
	médio	2,71	2,91
	alto	2,38	3,77
<b>BHA</b>	baixo	2,47	2,55
	médio	1,66	1,87
	alto	1,40	2,55

A precisão intermediária também foi avaliada sob as mesmas condições do método proposto em dias diferentes. A partir dos resultados obtidos de precisão deste método proposto pode-se verificar a variabilidade dos mesmos, que se encontram dentro dos critérios de aceitação do Inmetro que é para resultados de  $DPR \leq 11\%$ .

Os resultados da precisão no detector eletroquímico encontram-se expressos na tabela 14.

Tabela 14. Resultados da precisão dos ensaios realizados no detector eletroquímico.

Antioxidantes	Níveis	DPR (%) intra-dia	DPR (%) inter-dia
<b>PG</b>	baixo	3,49	3,62
	médio	2,63	2,78
	alto	1,52	1,69
<b>TBHQ</b>	baixo	3,27	3,59
	médio	1,69	1,71
	alto	4,02	4,27
<b>BHA</b>	baixo	4,49	4,56
	médio	2,92	3,05
	alto	1,53	1,88

### 6.3.1 Recuperação

A exatidão do método foi avaliada a partir de cálculos da recuperação, através da relação entre as concentrações obtidas experimentalmente e concentrações adicionadas (fortificadas) de antioxidantes sintéticos PG, TBHQ, BHA em amostra de biodiesel. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 15 e pode-se observar que foram obtidos resultados satisfatórios para os três antioxidantes sintéticos nos dois detectores utilizados, para o detector UV-Vis obtiveram-se resultados na faixa entre 95,78 – 101,66 % e para o detector Eletroquímico os resultados obtidos estavam na faixa entre 99,78 – 100,31. Segundo o Inmetro valores aceitos para validação de métodos analíticos devem apresentar resultados na faixa entre 80 – 110%.

Tabela 15. Resultados das médias das recuperações obtidas para os antioxidantes sintéticos: PG, TBHQ e BHA.

Médias de Recuperação, %		
Antioxidantes	Detector UV-Vis	Detector Eletroquímico
<b>PG</b>	100,26	100,07
<b>TBHQ</b>	101,66	100,31
<b>BHA</b>	95,78	99,78

A partir dos resultados obtidos da validação, pode-se pressupor que o mesmo apresenta a viabilidade da aplicação da técnica de cronoamperometria para quantificação e detecção de antioxidantes sintéticos em amostra de biodiesel, pois o método com auxílio da técnica



de cromatografia líquida de alta eficiência apresentou uma boa seletividade e linearidade com coeficientes de correlação dentro dos valores especificados maior que 0,99 para os três antioxidantes sintéticos PG, TBHQ e BHA, bem como resultados baixos de limites de precisão e quantificação e uma boa precisão.

Os resultados satisfatórios obtidos da seletividade podem ser relacionados também com a estrutura dos compostos analisados, a presença e quantidade de grupos funcionais ligados ao anel aromático. Os grupos hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), auxiliaram na obtenção de menor tempo de retenção devido a sua interação com a fase móvel utilizada.

Comparando os resultados obtidos empregando esta técnica com os resultados de outros autores que também estudaram alguns dos mesmos antioxidantes sintéticos utilizados neste trabalho, no entanto aplicando outras técnicas eletroquímicas, como (CASAGRANDE, 2017), que desenvolveu um método utilizando a técnica voltamétrica de pulso diferencial (DPV) com cromatografia líquida para análise direta de BHA, TBHQ, BHT e PG em biodiesel e utilizou como solução de eletrólito suporte o perclorato de tetra-hexilamônio e empregando ultramicroeletrodo (ume) de Platina como eletrodo de trabalho e eletrodo padrão de referência Ag/AgCl, obteve como resultados na voltametria de pulso diferencial, uma boa seletividade, recuperação de 116% para TBHQ e 104% para PG indicando boa precisão e exatidão. Para Análises em HPLC UV-Vis foi possível a detecção e quantificação simultaneamente BHT, BHA, TBHQ e PG, sem a necessidade de extração ou derivatização, com boa linearidade na faixa de concentrações entre 10 e 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

(SQUISSATO, A. L. et al, 2019), propôs um método para determinação simultânea e direta de cobre e de antioxidante TBHQ em biodiesel no qual utilizou a técnica de voltametria de onda quadrada em eletrodo de trabalho de disco de ouro e eletrodo padrão de referência Ag/AgCl em uma solução de eletrólito de 90% (v/v) de etanol e 10% (v/v) em água na presença de biodiesel e alcançou resultados de limite de detecção para 0,31  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e 1,2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para o Cu(II) e TBHQ, com alta precisão e bons resultados de recuperação.

(FREITAS, P. V., 2018), determinou ácidos fenólicos em amostra de vinhaça de cana – de – açúcar com técnicas de cromatográfica líquida com cronoamperometria com potencial +0,8V utilizando eletrodo de referência Ag/AgCl e eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho e eletrodo padrão de referência Ag/AgCl em uma solução de eletrólito composta de solução tampão acetado em pH = 5,0: água ultra pura. Como resultados obteve limites de detecção na faixa entre 1,6 e 97  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  com precisão no intervalo de 1,73–3,78%, mostrando assim a viabilidade da quantificação de antioxidantes por estas técnicas.

Tendo em vista dados na literatura e resultados do método proposto, verifica-se a possibilidade da utilização de mais de uma técnica eletroquímica para detecção e quantificação de antioxidantes em diferentes amostras complexas e com a junção da cromatografia líquida de alta eficiência para obtenção de boas separações e o alcance de resultados miniaturizados.

## 7 CONCLUSÃO

A aplicação do método proposto revelou resultados satisfatórios para a detecção e quantificação de antioxidantes sintéticos simultaneamente em amostra de biodiesel utilizando detector UV-Vis e eletroquímico. A junção da técnica eletroquímica e cromatográfica proporcionou uma alta sensibilidade e estabilidade, com limites de detecção e quantificação em baixas concentrações.

A diluição do biodiesel em metanol contribuiu para a homogeneização dos antioxidantes na fase móvel, auxiliando também uma melhor força de eluição da fase móvel devido a polaridade dos antioxidantes.

A detecção e quantificação dos antioxidantes sintético simultaneamente em detector UV-Vis aplicando um único comprimento de onda para os três antioxidantes, proporcionou bons resultados com limites baixos, alta resolução e estabilidade.

A avaliação realizada utilizando a técnica eletroquímica de cronocronoamperometria apresentou bom desempenho com o carbono vítreo como eletrodo de trabalho (sem necessidade de modificação), alcançou bons limites de detecção dos antioxidantes sintéticos aplicando potencial +0,8 V utilizando o eletrodo de referência padrão de hidrogênio, concordando com valores de potencial encontrados na literatura para antioxidantes sintéticos.

O método estatístico contribuiu para a exatidão dos resultados, viabilizando assim, a possibilidade da utilização do método proposto para detectar e quantificar antioxidantes sintéticos em amostras complexas.

Tendo em vista isto, o método mostrou ser viável e favorável para auxílio no controle da quantidade de antioxidantes sintéticos utilizados no biodiesel, visando um maior tempo da estabilidade oxidativa.

## 8 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para continuação deste trabalho pretende-se verificar a viabilidade da quantificação dos antioxidantes PG, TBHQ, BHA em amostra comercial de biodiesel, analisando em valores de ordem de (ng) nas mesmas condições utilizadas, pois o equipamento CLAE com detecção eletroquímica e UV-Vis permite verificar nessa escala de massas.

Avaliação da estabilidade oxidativa dos antioxidantes PG, TBHQ, BHA em amostra de biodiesel comercial e determinação da menor quantidade necessária para alcançar o limite mínimo de tempo de indução dos mesmos.

Avaliar também por meio da técnica de CLAE, o tempo de degradação do biodiesel exposto ao ar, luz e temperatura ambiente, tanto em amostras livres de antioxidantes sintéticos como fortificadas.

Verificar a viabilidade da utilização da técnica cronoamperometria de múltiplos pulsos do detector Década II em amostra de biodiesel com os antioxidantes sintéticos e analisar a ocorrência ou não de adsorção dos produtos gerados na superfície do eletrodo de carbono vítreo.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. G. B. F. Desenvolvimento de sensor eletroquímico à base de ferroceno carboxílico para detecção de HPA's em derivados de cana-de-açúcar. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

ALMEIDA, T. S. D. Síntese, caracterização e aplicação de nanoestruturas tridimensionais de grafeno decoradas por nanopartículas de óxidos de metais de transição. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourado, 2021.

ANDRADE, A. G. F.; CARAMIT, R. O.; ARAÚJO, T. A.; VIANA, L. H.; SOUZA, J. B. G.; TRINDADE, M. A. G.; FERREIRA, V. S. Otimização de Diferentes Procedimentos de Preparo de Amostras: Aplicação na Extração de Antioxidantes Presentes em Biodiesel. *Orbital: The Electroni Journal of Chemistry*. 2015.

ANTEC, L. User manual Flexcell. 7 ed. Zoeterwoude, 2009.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. *Cromatografia – Princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

ARAUJO, T. A. ; BARBOSA, A. M. J.; VIANA, L. H.; FERREIRA, V. S.. Electroanalytical determination of TBHQ, a synthetic antioxidant, in soybean biodiesel samples. *Fuel*, v. 90, p. 707-712, 2011.

ARAÚJO, T. A. DE; BARBOSA, A. M. J. ; VIANA, L. H. ; FERREIRA, V. S.. Voltammetric determination of tert-butyl hydroquinone in biodiesel using a carbon paste electrode in the presence of surfactant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, p. 409-414, 2010.

BELUOMINI, M. A.; SILVA, J. L. e STRADIOTTO, N.R., 2018. Amperometric determination of myo-inositol by using a glassy carbon electrode modified with molecularly imprinted polypyrrole, reduced graphene oxide and nickel nanoparticles. *Microchim Acta*, v.170, 2018.

BHARTI, R.; SINGH, B. Green tea (*Camellia assamica*) extract as an antioxidant additive to enhance the oxidation stability of biodiesel synthesized from waste cooking oil. *Fuel*, v. 262, 2020.

BRASIL, Resolução nº45 de 25 de Agosto de 2014. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, Ministério de Minas e Energia, Brasília, 2014.

BRASIL, Resolução nº798 de 1 de Agosto de 2019. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, Ministério de Minas e Energia, Brasília, 2019.

BRASIL, Nota Técnica Conjunta nº10/2021/ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, Ministério de Minas e Energia, Brasília, 2021.

BRASIL, Painel Dinâmico de Produtores de Biodiesel, 2022. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP. Disponível em:<<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/paineis-dinamicos-da-anp/paineis-e-mapa-dinamicos-de-produtores-de-com-bustiveis-e-derivados/painel-dinamico-de-produtores-de-biodiesel>> Acesso em: 10 de mar. 2022.

BRASIL, Lei nº13.263, de 23 de março de 2016. **Dispõe sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional.** Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, Ministério de Minas e Energia, Brasília, 2016.

BRASIL, Lei nº13.033 de setembro de 2014. **Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final.** Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, Ministério de Minas e Energia, Brasília, 2014.

BRASIL, Resolução CNPE nº16, de 29 de outubro de 2018. Conselho Nacional de política energética – CNPE, Ministério de Minas e Energia, Brasília, 2018.

BRASIL, Consolidado da legislação brasileira de aditivos alimentares de 30 de Janeiro de 2014, p. 1-193. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Disponível em:<[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a6809d8047457a1c86c0d63fbc4c6735/Compendio\\_marco\\_2011.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a6809d8047457a1c86c0d63fbc4c6735/Compendio_marco_2011.pdf?MOD=AJPERES)> acesso em: 12 abr. 2021.

BRASIL, Resolução CSN/MS n.º 04, de 24 de novembro de 1988. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Ministério da Saúde, Brasília, 1988.

BRASIL, Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Ministério da Saúde, Brasília, 2017.

BRASIL, Orientações sobre validação de métodos analíticos, 2020. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. Documento de caráter orientativo, rev. 09, jun., 2020.

BRASIL, Resolução CNPE nº25, de 22 de novembro de 2021. Conselho Nacional de política energética – CNPE, Ministério de Minas e Energia, Brasília, 2011.

CARAMIT, R. P.; ANDRADE, A. G. F.; SOUZA, J. B. G.; ARAUJO, T. A. A.; VIANA, L. H.; TRINDADE, M. A. G.; FERREIRA, V. S. A new voltammetric method for the simultaneous determination of the antioxidants TBHQ and BHA in biodiesel using multi-walled carbon nanotube screen – printed electrodes. *Fuel*, v.105, p. 306 - 313, 2013.

CARVALHO, A. L. Biodiesel de soja: Estudo sobre estabilidade e produtos de oxidação. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

CASAGRANDE, M. Técnicas Voltamétricas e Cromatográficas na Análise Direta de Antioxidantes em Biodiesel Diluído em Metanol e Etanol ou Como Microemulsão Livre de Surfactante. Tese Doutorado. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química. Porto Alegre, 2017.

CAVALHEIRO, L. F. Caracterização dos Resíduos Sólidos de Biodiesel Comercial de Soja e suas Misturas. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. ed. Unicamp, 6ª reimpressão, São Paulo, 2017.

CONEJO, L. S. Processamento e caracterização de compósitos multifuncionais de resina furfurilica/cnt/fibra de carbono. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Guaratinguetá, 2019.

DELFINO, J. R. Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação do teor de água em biodiesel por espectroscopia de impedância eletroquímica. Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2014.

DELFINO, J. R. Desenvolvimento de detectores eletroquímicos baseados em eletrodos modificados com materiais nanoestruturados para determinação de antioxidantes em bioquerosene de aviação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.

DEVARAJAN, Y. D.; NAGAPPAN, B.; MAGESHWARAN, G.; KUMAR, M. S.; DURAIRAJ, R. B. Feasibility study of employing diverse antioxidants as an additive in research diesel engine running with diesel-biodiesel blends. *Fuel*, v. 277, 2020.

DE RESENDE, M. A. C.; DA SILVA, D. N.; PEREIRA, A. C. Sistemas de injeção em fluxo e em batelada com detecção eletroquímica aplicados na determinação de fármacos. *Revista Virtual Química*, v. 12, n. 5, 2020.

DURIGAN, B. Desenvolvimento de sensor baseado em eletrodo modificado com nanotubos de carbono contendo pentacianonitrosilferratos de metais para determinação de antioxidantes em microemulsão de Biodiesel. Dissertação. Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2014.

FALCÃO, H. R. C. Síntese e caracterização de novo antioxidante fenólico derivado da biomassa da castanha de caju (LCC-técnico) para biodiesel por método eletroanalítico. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2016.

FERNANDES, D. S. Quantificação eletroquímica de analitos de interesse Ambiental e biológico, empregando novos materiais Preparados a partir de silsesquioxanos funcionalizados. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Ilha Solteira, 2015.

FREITAS, O. N. Estudo de Diversas Misturas de Biodiesel de Óleo de Soja e de Sebo Bovino. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

FREITAS, P. V.; SILVA, D. R.; BELUOMINI, M. A.; SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Determination of Phenolic Acids in Sugarcane Vinasse by HPLC with Pulse Amperometry. *Hindawi - Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018.

GALVAN, D.; ORIVES, J. R.; COPPO, R. L.; RODRIGUES, C. H. F.; SPACINO, K. S.; PINTO, J. P.; BORSATO, D. Estudo da cinética de oxidação de biodiesel B100 obtido de óleo de soja e gordura de porco: Determinação de energia de ativação. *Química Nova*. v. 37, p. 244-248, 2014.

GATO, F. S. Avaliação de antioxidantes naturais e sintéticos na estabilidade oxidativa de biodiesel de macaúba (*Acrocomia Aculeata*). Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2016.

GOULART, L. A.; TEIXEIRA, A. R. L.; RAMALHO, D. A.; TEREZO, A. J.; CASTILHO, M. Development of an analytical method for the determination of tert-butylhydroquinone in soybean biodiesel. *Fuel*. v. 115, p. 126 – 131, 2014.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A. e CROUCH, S. R. *Princípios de Análise Instrumental*. ed. 6, Porto Alegre: Bookman, 2009.



KRAUSE, L. C. Desenvolvimento do Processo de Produção de Biodiesel de Origem Animal. Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

LIMA, D. Eletrodo de pasta de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro estabilizadas em porfirina: potenciais aplicações para detecção do agente antitumoral 5-fluorouracil. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2016.

MEHLENBACHER, V. C.; HOPPER, T. H.; SALLEE, E. M.; LINK, W. E.; WALKER, R. O.; WALKER, R. C.; FIRESTONE, D. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society (AOCS). ed. 5, Champaign, 2003.

MONTEIRO, T. O.; TANAKA, A. A.; SAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. Photoelectrochemical determination of tert-butylhydroquinone in edible oil samples employing CdSe/ZnS quantum dots and LiTCNE. Food Chemistry, v. 227, p. 16-21, 2017.

MORAES, M. S. A.; KRAUSE, L. C.; CUNHA, M. E.; FACCINI, C. S.; MENEZES, E. W.; VESES, R. C.; RODRIGUES, M. R. A.; CARAMÃO, E. B. Biodiesel de Sebo: Avaliação de Propriedades e testes de Consumo em um Motor a Diesel. Combustíveis Energéticos. v.22, n. 3, p.1949-1954, 2008.

MORETTI, E. S. Dissertação Mestrado. Síntese de Poli (Ácido Metacrílico – Hemina) Molecularmente Impresso Suportado em Nanotubos de Carbono para determinação Voltamétrica Simultânea de Antioxidantes em Matrizes Lipídicas e Biodiesel. Londrina, 2016.

OLIVEIRA FILHO, W. P. Utilização de Cromatografia em fase gasosa para a determinação de antioxidantes sintéticos em biodiesel: Uma abordagem metrológica. Universidade de São Paulo. Tese Doutorado em Química. São Carlos, 2013.

OLIVEIRA, F. M. Desenvolvimento de metodologias para determinação de Parâmetros cinéticos de reações eletroquímicas simples. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

OLIVEIRA, G. K. F. Análise por injeção em batelada com detecção amperométrica da astaxantina e da capacidade antioxidante em alimentos. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. e VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. Ed. 4, São Paulo: Cengage, 2015.

PAVANELLO, G. P. Aplicação de antioxidante natural em biodiesel. Dissertação (Mestre em Bioenergia), Universidade Estadual do Centro – Oeste, Guarapuava, 2017.

PIVA, R. B. Economia ambiental sustentável: Os combustíveis fósseis e as alternativas energéticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

RODRIGUES, J. S.; VALLE, C. P.; UCHOA, A. F. J.; RAMOS, D. M.; PONTE, F. A. F.; RIOS, M. A. S. R.; MALVEIRA, J. Q.; RICARDO, N. M. P.S. Comparative study of synthetic and natural antioxidants on the oxidative stability of biodiesel from Tilapia oil. *Renewable Energy*, v. 156, p. 1100-1106, 2020.

SÁ PLOÊNCIO, L. A. Desenvolvimento e validação de um método para determinação de sacarose em mel por cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

SANTOS, M.A., Fontes de energia nova e renovável. Rio de Janeiro: LTC, 2013.

SCHAUMLOFFEL, L. S.; DAMBROS, J. W. V.; FERNANDES, P. R. B.; PIATNICKI, C. M. S. Direct and simultaneous determination of four phenolic antioxidants in biodiesel using differential pulse voltammetry assisted by artificial neural networks and variable selection by decision trees. *Fuel*, v.236, p.803-810, 2019.

SILVA, E. S. Avaliação de antioxidantes naturais na estabilidade de biodiesel de soja. Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2017.

SILVA, G. B. Estudo da influência de antioxidantes na avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel pelo método PetroOXY. Dissertação (Mestre em Química), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015.

SILVA, R. S. R. Processamento e caracterização do carbono vítreo reticulado modificado com grafite expandida. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2020.

SILVA, S. D. Investigação do potencial da utilização do fungo *Aspergillus brasiliensis* na degradação de efluentes contaminados com petróleo. Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2012.

SILVA, T. M. L. Desenvolvimento e validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para pesquisa de enrofloxacin e ciprofloxacina em dejetos de poedeiras. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. Tradução da 8ª edição norte-americana, ed. Thomson, 2006.

SOUZA, A. A. S.; CORREA, A. P. L.; SILVA, P. M. M e CONCEIÇÃO, L. R. V. Avaliação do potencial de misturas de antioxidantes naturais e sintético na estabilidade oxidativa de biodiesel. Brazilian Journal os Development. V.7, n. 2, p. 11782-11799, Curitiba, 2021.

SQUISSATO, A. L; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Voltammetric determination of copper and *tert*-butylhydroquinone in biodiesel: A rapid quality control protocol. Talanta, v. 201, p.433-440, 2019.

STRATMANN, A. S. S. Uso do sistema de análise por injeção em batelada e cdtrodo para determinação de quercetina. Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2020.

TANG, J.; MAO, Y.; GUO, J.; ZHANG, C.; JIN, B. Simultaneous Determination of TBH<sub>2</sub>Q and BHA Antioxidants In Food Samples Using Eosin Y Film Modified Electrode. Food Analytical Methods. v.11, p.3380–3390, 2018.

TORMIN, T. F., Análise por injeção em batelada associada à detecção amperométrica: desenvolvimento de métodos rápidos para a determinação de antioxidantes em biodiesel. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

UGUZ, G.; ATABANI, A. E.; MOHAMMED, M. N.; SHOBANA, S.; UGUZ, S.; KUMAR, G.; AL – MUHTASEB, A. H. Fuel stability of biodiesel from waste cooking oil: A comparative evaluation with various antioxidants using FT-IR and DSC techniques. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 21, 2019.

VOGEL, A. I. Análise Química quantitativa, ed. 6, Rio de Janeiro: LTC, 2008.

VOLZ, M. D. A. Biodiesel a partir de Óleos de Alta Acidez: Desenvolvimento de um Processo Catalítico Homogêneo. Tese (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental), Escola de Química e Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2009.