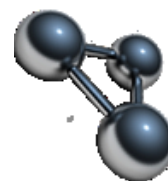


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

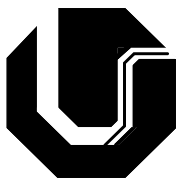
Programa de Pós-Graduação em Química



**Determinação Eletroquímica de Glicerol em Biodiesel por Amperometria
de Múltiplos Pulsos com Eletrodo de Ouro**

TATIELLI GONÇALVES GREGÓRIO BARBOSA

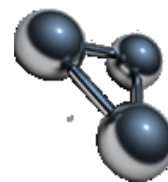
UBERLÂNDIA, JUNHO – 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química



**Determinação Eletroquímica de Glicerol em Biodiesel por Amperometria
de Múltiplos Pulsos com Eletrodo de Ouro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Mestranda: Tatielli Gonçalves Gregório Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

Área de Concentração: Química Analítica

UBERLÂNDIA, JUNHO – 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

B238d Barbosa, Tatielli Gonçalves Gregório, 1986-
2012 Determinação eletroquímica de glicerol em biodiesel por amperometria
de múltiplos pulsos com eletrodo de ouro / Tatielli Gonçalves Gregório
Barbosa. - 2012.
54 f. : il.

Orientador: Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Biodiesel - Teses. 3. Glicerina - Teses. I. Abarza Muñoz, Rodrigo Alejandro. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 144/COPGQ.

DATA: 22/06/2012

DISCENTE: Tatielli Gonçalves Gregório Barbosa

MATRÍCULA: 11012QMI012

TÍTULO DO TRABALHO: Determinação eletroquímica de glicerol em biodiesel por amperometria de múltiplos pulsos com eletrodo de ouro.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

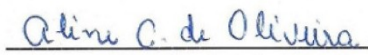
LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

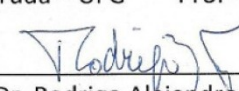
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de sensores eletroquímicos para o controle de qualidade de biodiesel em tempo real.

Às treze horas e trinta minutos do dia vinte e dois de junho do ano dois mil e doze, no Auditório C do Bloco 50, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Andréa Fernandes Arruda, da Universidade Federal de Goiás, Aline Carlos de Oliveira, do Instituto de Química da UFU e Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, professor orientador e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa apresentou a candidata e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 01/2010/COPGQ. Em seguida, o presidente da mesa concedeu a palavra à candidata para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o apresentador. A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprovou o candidato. Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Determinação Eletroquímica de Glicerol em Biodiesel por amperometria de múltiplos pulsos com eletrodo de ouro.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 15 horas e 05 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Profª Dra. Andréa Fernandes Arruda – UFG


Profª Dra. Aline Carlos de Oliveira – IQUFU


Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz – IQUFU

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu primeiro agradecimento pelo dom da vida.

A meus pais, Ilza e Guilherme, por estarem presentes na minha vida, por incentivarem sempre meu crescimento.

A meus irmãos, Cybelli e Danilo, pela partilha na jornada, pelas discussões e pelos abraços.

A Dógo Santos Silva, pelo companheirismo e apoio.

A Julia Garofano dos Santos, pela amizade, por estar ao meu lado sempre disposta a ajudar.

Ao meu orientador, professor Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, pelos ensinamentos e pela paciência.

Ao professor Dr. Eduardo Mathias Richter, pelos questionamentos e contribuições.

Aos colegas de laboratório, pela convivência e por tornar o ambiente tão agradável.

Aos vigilantes da UFU, por colaborar na realização das atividades de pesquisa aos fins de semana e feriados.

Ao Programa de Pós Graduação em Química, especialmente à secretária Mayta Mamede Negreto Peixoto, pela assistência em todas as etapas do processo.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	01
1.1. Biodiesel	01
1.2. Glicerol	05
1.2.1. Determinação de glicerol.....	05
1.3. Técnicas eletroquímicas	09
1.3.1. Voltametria cíclica	10
1.3.2. Amperometria	10
1.3.2.1. Amperometria a potencial constante	11
1.3.2.2. Amperometria de múltiplos pulsos	11
1.4. Eletrodo de trabalho	12
1.4.1. Eletrodos de ouro e platina	12
1.4.1.1. Comportamento eletroquímico do glicerol	12
1.4.2. Eletrodo de carbono vítreo.....	13
1.4.2.1. Filme de hexacianoferrato de óxido de rutênio.....	14
1.4.3. Eletrodo de diamante dopado com boro	14
1.4.4. Eletrodos compósitos de grafite	15
1.5. Separação de glicerol do biodiesel	17
1.6. Sistema em fluxo	17
1.7. Objetivos	19
1.7.1. Objetivo Geral	19
1.7.2. Objetivos Específicos	19
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	20
2.1. Reagentes e preparo de soluções	20
2.2. Instrumentação e materiais	20
2.3. Eletrodo de ouro	21

2.3.1. Voltametria cíclica	21
2.3.2. Sistema FIA	21
2.3.3. Amperometria	22
2.3.4. Preparo de amostras de biodiesel	23
2.3.5. Parâmetros de mérito.....	24
2.3.5.1. Precisão	24
2.3.5.1.1. Repetitividade	24
2.3.5.1.2. Precisão intermediária	24
2.3.5.1.3. Reprodutibilidade	24
2.3.5.2. Seletividade	25
2.3.5.3. Exatidão	25
2.3.5.4. Sensibilidade.....	25
2.3.5.5. Linearidade	25
2.3.5.6. Faixa de trabalho	26
2.3.5.7. Limite de detecção.....	26
2.3.5.8. Limite de quantificação	26
2.3.5.9. Robustez	26
2.4. Eletrodo de platina.....	27
2.5. Eletrodo de carbono vítreo	27
2.5.1. Formação do filme de hexacianoferrato de óxido de rutênio.....	27
2.5.2. Determinação eletroquímica de glicerol	27
2.6. Eletrodo de diamante dopado com boro.....	27
2.6.1. Construção e ativação do eletrodo	27
2.6.2. Determinação eletroquímica de glicerol	28
2.7. Eletrodos compósitos.....	28
2.7.1. Modificação de grafite com partículas de ouro.....	28
2.7.2. Preparo do compósito	28
2.7.3. Construção dos eletrodos.....	29
2.7.4. Testes eletroquímicos	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30
3.1. Eletrodo de ouro	30
3.1.1. Voltametria cíclica	30
3.1.2. Amperometria	31
3.1.3. Sistema FIA	34

3.1.4. Preparo de amostras de biodiesel	34
3.1.5. Parâmetros de mérito	35
3.1.5.1. Precisão	35
3.1.5.1.1. Repetitividade	35
3.1.5.1.2. Precisão intermediária	36
3.1.5.2. Exatidão	37
3.1.5.3. Sensibilidade	38
3.1.5.4. Linearidade	38
3.1.5.5. Faixa de trabalho	39
3.1.5.6. Limite de detecção	40
3.1.5.7. Limite de quantificação	40
3.1.5.8. Robustez	40
3.2. Eletrodo de platina	40
3.3. Eletrodo de carbono vítreo revestido com filme de RuOHCF	42
3.4. Eletrodo de diamante dopado com boro	43
3.5. Eletrodos compósitos	44
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO

O biodiesel é o combustível derivado de óleos vegetais ou gorduras animais que pode substituir parcial ou totalmente o diesel de petróleo. Além de ser obtido de fontes renováveis, é menos poluente que diesel de petróleo e biodegradável. Uma desvantagem do biodiesel é o coproduto da reação de transesterificação da matéria prima, o glicerol, que pode causar danos aos motores de combustão e, por isso, é limitado a 0,25 % (m/m) como glicerol total, e 0,02 % (m/m) como glicerol livre, por regulamentações técnicas como a ANP 7, ASTM D 6751 e EN 14214.

Este trabalho propõe um método de determinação amperométrica de glicerol livre em biodiesel utilizando eletrodo de ouro como detector, em meio básico, acoplado a sistema de análise por injeção em fluxo (FIA). A caracterização voltamétrica do glicerol foi realizada de -0,8 a 0,5 V, verificando o perfil eletroquímico típico concordante com a literatura. Para a determinação de glicerol no sistema FIA, foi empregada a amperometria de múltiplos pulsos sendo aplicados três pulsos de potencial sequenciais: -0,2; 0,25 e 0,7 V, cada um aplicado por 100 ms. O glicerol livre foi extraído para a fase aquosa analisada por meio de agitação em vortex seguida por centrifugação. O sistema FIA foi avaliado em função da obtenção do maior sinal de corrente para a detecção de glicerol. As melhores condições foram 150 μL de alça de amostragem e vazão de 4,0 mL min^{-1} .

Para validação foram determinados alguns parâmetros como repetitividade, linearidade, recuperação, limites de detecção e quantificação. Os seguintes resultados foram obtidos: repetitividade com baixo desvio padrão (4,8% para 14 injeções), alta frequência analítica (100 injeções h^{-1}), valores de recuperação de 96% a 117%, faixa linear de 49,10 a 2288 $\mu\text{mol L}^{-1}$, limite de detecção de 14,73 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de quantificação de 49,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Portanto, a determinação de glicerol livre em biodiesel com extração aquosa e detecção em eletrodo de ouro em meio básico sob fluxo pode ser utilizada para determinar concentrações menores que 15,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glicerol, enquanto que o limite máximo regulamentado é de 200 ppm, o que corresponde a 2,17 mmol L^{-1} .

Palavras-chave: biodiesel, glicerol, análise por injeção em fluxo, eletrodo de ouro, amperometria pulsada.

ABSTRACT

Biodiesel is the fuel obtained from vegetable oils or animal fats that can partially or totally replace diesel oil. Besides being obtained from renewable sources, biodiesel is less polluting than diesel and biodegradable. One disadvantage of biodiesel is the byproduct of transesterification reaction of raw material, glycerol, which can cause damages to combustion engines and therefore is limited to 0.25 % (m/m) as total glycerol and 0.02 % (m/m) as free glycerol according to technical regulations as ANP 7, ASTM D 6751 and EN 14214.

This paper proposes an amperometric method for the determination of free glycerol in biodiesel at gold electrode in basic medium, coupled with flow injection analysis system (FIA). Voltammetric characterization was made from -0.8 to 0.5 V, verifying an electrochemical profile consistent with literature. To glycerol determination in the FIA system, multiple pulse amperometry was used with application of three sequential potentials: -0.2, 0.25 and 0.7 V, each one applied for 100 ms. Free glycerol was extracted to the analyzed aqueous phase by vortex stirring (5 min) followed by centrifugation (5 min). FIA system was evaluated in order to obtain the highest current signal to glycerol detection. Best conditions were sampling loop of 150 μL and flow of 4.0 mL min^{-1} .

To validate some parameters as repeatability, linearity, recovery, detection and quantification limits were determined. The repeatability had low standard deviation (4.8% with 14 injections), high analytical frequency (100 injections h^{-1}), recovery values from 96% to 117 %, linear range from 49.10 to 2288 $\mu\text{mol L}^{-1}$, detection limit of 14.73 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e quantification limit of 49.10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Therefore, the determination of free glycerol in biodiesel based on aqueous extraction and gold electrode detection in basic medium under flow can be used to determine concentrations less than 15.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ glycerol, while the regulated upper limit is 200 ppm, which corresponds to 2.17 mmol L^{-1} .

Keywords: biodiesel, glycerol, flow injection analysis, gold electrode, pulsed amperometry

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AE	Adesivo Epóxi
AMP	Amperometria de Múltiplos Pulsos
AMP-FIA	Análise Amperométrica de Múltiplos Pulsos com Injeção em Fluxo
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	ASTM International, antiga <i>American Society for Testing and Materials</i> – Sociedade Americana de Testes e Materiais
B100	Biodiesel, combustível composto de alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais conforme a especificação contida no Regulamento Técnico nº 4/2004 da ANP
B2	Mistura óleo diesel/biodiesel; combustível comercial composto de 98% em volume de óleo diesel e 2% em volume de biodiesel, que deverá atender à especificação prevista pela Portaria ANP nº 310 de 27 de dezembro de 2001 e suas alterações
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
C18	Cartucho de sílica para extração em fase sólida com 18% de carbono
CCD	<i>Charge Couple Device</i> – Dispositivo de Carga Acoplada; detector multicanal de fotóns
CEIAE	Cromatografia de Exclusão Iônica de Alta Eficiência
CEN	<i>Comité Européen de Normalisation</i> – Comitê Europeu de Normalização
CET	Cromatografia por Exclusão de Tamanho
CFS	Cromatografia de Fluido Supercrítico
CG	Cromatografia Gasosa
CI	Cromatografia de Íons
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-ET	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Exclusão de Tamanho
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CPG	Cromatografia de Permeação em Gel
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DAP	Deteção por Amperometria Pulsada
DDB	Diamante Dopado com Boro
DEEL	Detector Evaporativo de Espalhamento de Luz
DIC	Detector de Ionização em Chama
DIR	Detector de Índice de Refração
DV	Detector Viscosimétrico
EA	Eletrodo Auxiliar
EC	Eletroforese Capilar
EE	(Método) Enzimático-Eletroquímico

EM	Espectrometria de Massa
EN	<i>European Norm</i> – Norma Européia
ER	Eletrodo de Referência
ER-H	Eletrodo de Referência de Hidrogênio
E_{step}	Potencial de passo, intervalo de incremento do potencial aplicado
ET	Eletrodo de Trabalho
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i> – Análise por Injeção em Fluxo
G	Glicerol
GLP	Gás Liquefeito de Petróleo; “gás de cozinha”
HCl	Ácido clorídrico
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IR	Índice de Refração
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> – Organização Internacional para Padronização
IV	Espectrometria no Infravermelho Próximo
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
mbd	Milhões de barris por dia
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i> – Organização para a Co-operação e Desenvolvimento Econômico
PA ACS	Reagente para análise (PA), segundo as especificações da <i>American Chemical Society</i> (ACS) – Sociedade Americana de Química
PI	Padrão Interno
ppm	Partes por milhão, equivale a mg L^{-1}
PTFE	Politetrafluoretileno
PVC	Policloreto de vinila
R	Coeficiente de correlação linear
Ref.	Referência
RMN- H^1	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
THF	Tetrahidrofurano
TMCS	Trimetilclorosilano
t_{step}	Tempo de aplicação do potencial
UV	Detector Ultravioleta
UV-Vis	Espectrofotometria Ultravioleta-Visível
VC	Voltametria cíclica
ΔE	Faixa de potencial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transesterificação de triglicerídeos com álcool de cadeia curta e catalisador obtendo mistura de ésteres	01
Figura 2. Produção mensal de biodiesel de 2005 a 2011	04
Figura 3. Forma de onda de potencial triangular variando com o tempo (A), e voltamograma cíclico típico para um processo redox reversível (B)	10
Figura 4. Estruturas dos componentes básicos do adesivo epóxi (A e B) e representação das suas ligações cruzadas (C)	16
Figura 5. Esquema do sistema FIA utilizado (A) com detalhe do injetor comutador (B)	22
Figura 6. Voltamogramas cíclicos em meio de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ (—) e após a adição de glicerol 1,0 mmol L ⁻¹ (- - -), no primeiro ciclo (A) e após o décimo quinto ciclo (B). Varredura de -1,2 a 0,5 V, velocidade de 50 mV s ⁻¹ , E _{step} de 5 mV	30
Figura 7. Voltamograma cíclico em meio de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ com concentrações crescentes de glicerol, de 0,5 a 6,5 mmol L ⁻¹ . Varredura de -0,8 a 0,5 V, velocidade de 50 mV s ⁻¹	31
Figura 8. Voltamograma hidrodinâmico de eletrodo de ouro em meio de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ , injeção de glicerol 100 µmol L ⁻¹ , em sistema de batelada sob agitação magnética constante (A) e em sistema FIA (B)	32
Figura 9. Superfície metálica do eletrodo de ouro, antes (A) e depois de análise (B)	32
Figura 10. Amperograma FIA em meio de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ com injeções repetitivas de glicerol padrão 0,1 mmol L ⁻¹ em três níveis de potencial: -0,2; 0,25; 0,7 V	33
Figura 11. Amperogramas com variação de parâmetros do sistema FIA: volumes de injeção (A) dados em µL, e velocidade de injeção (B) dada em mL min ⁻¹	34
Figura 12. Faixas de recuperação nos diferentes sistemas de extração	34
Figura 13. Amperograma de eletrodo de ouro em meio de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ com injeções repetitivas de glicerol padrão 1108 µmol L ⁻¹ . Condições: 150 µL de volume de injeção, 4,0 mL min ⁻¹ de vazão, potenciais de -0,2; 0,25 e 0,7 V	35
Figura 14. Resíduo de corrente para amostras de padrão de glicerol 150,0 µM	36
Figura 15. Amperograma FIA para injeções em triplicata de padrões de glicerol (2, 5, 10 e 20 µmol L ⁻¹) e para amostras de biodiesel (Amostra 1 e Amostra 2) sem (A) e com fortificação (A1 e A2) em dois níveis. Condições como na Figura 13. Sistema de extração 4	37
Figura 16. Amperograma e curva analítica de padrões de glicerol de 100 a 1684 µmol L ⁻¹ , em eletrodo de ouro por AMP-FIA em meio de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ . Condições como na Figura 13	38
Figura 17. Amperograma de padrões de glicerol de 49,10 a 2288 µmol L ⁻¹ , em eletrodo de ouro por AMP-FIA em meio de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ . Condições como na Figura 13	39
Figura 18. Curva analítica de padrões de glicerol de 1 a 2288 µmol L ⁻¹ , em eletrodo de ouro por AMP-FIA em meio de NaOH 0,1 mol L ⁻¹	39

Figura 19. Voltamogramas cíclicos de concentrações crescentes de glicerol em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} com eletrodo de platina	41
Figura 20. Curvas analíticas de padrões de glicerol de 4,075 a 122,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em eletrodo de platina em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} . Sinais de oxidação em 0,65 V (A) e 1,3 V (B)	41
Figura 21. Voltamogramas cíclicos de eletrodo de carbono vítreo com filme de RuOHCF após 60 ciclos em ácido sulfúrico 0,5 mol L^{-1} (—) e ácido perclórico 0,1 mol L^{-1} (—■—). Condições: varredura de -0,4 a 1,3 V; velocidade de 50 mV s^{-1}	42
Figura 22. Voltamograma cíclico em meio de HClO_4 0,1 mol L^{-1} com concentrações crescentes de glicerol, de 5,0 a 100,0 mmol L^{-1} . Condições como na Figura 21	42
Figura 23. Voltamogramas cíclicos com eletrodo de diamante dopado com boro em seis diferentes eletrólitos e quatro faixas de potencial: -1,0 a 1,0 V (A); -1,0 a 1,5 V (B); -1,0 a 2,0 V (C) e -1,0 a 2,5 V (D)	43
Figura 24. Voltamogramas cíclicos com eletrodo de diamante dopado com boro em meio de tampão acetato (—) e tampão fosfato (—), antes e após a adição de glicerol 1,0 mmol L^{-1}	44
Figura 25. Voltamogramas cíclicos de eletrodo compósito modificado com partículas de ouro em meio de NaOH (—), H_2SO_4 (—), e HClO_4 (—), todos a 0,1 mol L^{-1} , nas faixas de potencial de (A) 0 a 0,8V; (B) 0 a 1,0V; (C) 0 a 1,2V.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Demanda mundial de petróleo, de 2010 a 2012, milhões de barris por dia	02
Tabela 2. Demanda mundial por produto e variação de 2011 a 2012, milhões de barris por dia	03
Tabela 3. Produção anual de biodiesel no Brasil, em barris	03
Tabela 4. Produção mensal de biodiesel em 2012, dados em barris, com variação acumulada	04
Tabela 5. Alguns componentes e valores máximos especificados por resoluções para comercialização de biodiesel em Estados Unidos, União Europeia e Brasil	05
Tabela 6. Métodos para determinação de glicerol livre em biodiesel	06
Tabela 7. Métodos para determinação de glicerol total em biodiesel	08
Tabela 8. Sistemas de extração de glicerol de biodiesel	23
Tabela 9. Níveis de fortificação nos diferentes sistemas de extração	23
Tabela 10. Faixas de potencial aplicadas por voltametria cíclica para determinação de glicerol utilizando eletrodos compósitos de grafite modificado com partículas de ouro	29
Tabela 11. Valores de correntes para concentração de $150,0 \mu\text{mol L}^{-1}$	36
Tabela 12. Concentração de glicerol em duas amostras de biodiesel analisadas pelo método FIA-AMP após extração pelo Sistema 4 e os respectivos valores de recuperação (n=3)	38

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Biodiesel

No Brasil, a Medida Provisória nº 214, de 13 de setembro de 2004, define biodiesel como “combustível para motores a combustão interna com ignição por compressão, renovável e biodegradável, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil”. Porém, o único tipo já enquadrado nesta lei corresponde ao “combustível composto de alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou gorduras animais”, conforme o Regulamento Técnico nº 4/2004, anexo a Resolução nº 42/2004 da Agência Nacional de Petróleo (ANP) [1, 2].

O biodiesel é obtido pelo processo de transesterificação de triglicerídeos de óleos vegetais ou gorduras animais reagindo com alcoóis de cadeia curta, de um a oito carbonos, na presença de catalisadores básicos, ácidos ou enzimáticos, obtendo-se ésteres alquílicos e glicerol livre como coproduto. Dentre os alcoóis que podem ser utilizados na reação, metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico são os mais favoráveis; metanol e etanol são os mais utilizados por terem baixo custo e menor cadeia carbônica, ou seja, maior polaridade. Os catalisadores básicos incluem hidróxidos de sódio e potássio, alcóxidos e carbonatos, e são mais utilizados, pois promovem maior velocidade de reação que catalisadores ácidos e enzimáticos. [2-4]. A Figura 1 apresenta um esquema da reação de transesterificação.

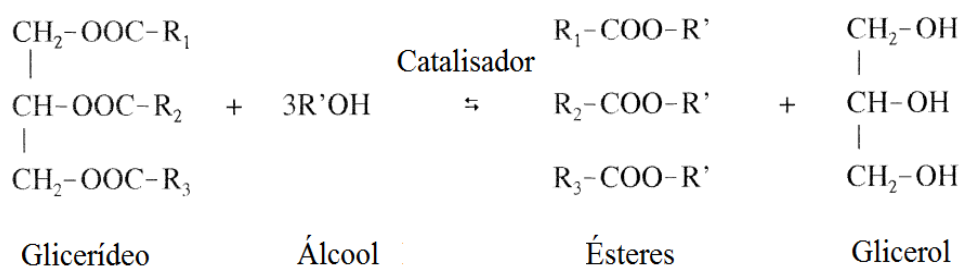


Figura 1. Transesterificação de triglicerídeos com álcool de cadeia curta e catalisador obtendo mistura de ésteres [4].

Reações incompletas levam à formação de intermediários residuais de glicerol, como mono e diglicerídeos (glicerol ligado), enquanto que, a conversão completa resulta em glicerol altamente solúvel em água (glicerol livre). Ao fim da reação, há um tempo de repouso para separação de fases: uma fase orgânica menos densa consistindo de ésteres de ácidos graxos, e uma fase mais densa composta de glicerol e outros componentes residuais. No entanto, pequenas quantidades de glicerol permanecem na fase orgânica, com uma solubilidade estimada em 200 mg Kg⁻¹ a 0°C, podendo chegar a 300 ou 500 mg kg⁻¹ [5, 6].

O biodiesel é utilizado como combustível alternativo ao diesel de petróleo por ser:

- miscível em qualquer proporção com diesel, e outras substâncias, como água;
- compatível em praticamente todas as propriedades com o diesel;
- derivado de matérias-primas renováveis de ocorrência natural, reduzindo a dependência do combustível fóssil;
- biodegradável;

- menos poluente que diesel de petróleo, já que não apresenta componentes de enxofre, reduzindo as emissões presentes nos gases de exaustão, com exceção dos óxidos de nitrogênio;
- de manuseio e armazenamento mais seguros, devido ao alto ponto de fulgor.

Porém, existem desvantagens na utilização de biodiesel como combustível. O alto custo de produção, por exemplo, é uma delas. O refino de petróleo já é um processo consolidado, enquanto que a reação de transesterificação precisa de condições específicas para obtenção de rendimento satisfatório em escala industrial. Enquanto que o refino consiste, de forma simplificada, numa destilação com obtenção direta de diesel, na transesterificação, a matéria-prima deve ter um teor mínimo de pureza e após a reação é preciso separar biodiesel de glicerol até níveis aceitáveis de comercialização.

O interesse no biodiesel como combustível alternativo produzido a partir de fontes renováveis tem crescido ao longo dos anos devido: ao aumento mundial da demanda por petróleo chegando a 89,9 milhões de barris por dia (mbd) em 2012, um aumento de 0,9% em comparação a 2011 [7]; à diminuição das fontes de combustíveis fósseis; ao aquecimento global, pois biodiesel apresenta menor impacto ambiental se comparado ao diesel de petróleo; à intenção de países importadores de petróleo em reduzir a dependência de produtos de origem fóssil; à sua completa miscibilidade com o óleo diesel.

Sobre a demanda mundial de petróleo, a Tabela 1 apresenta o total de barris por dia, em milhões, de 2010 a 2012, incluindo valores previstos até o fim de 2012. As regiões em que se divide a demanda são regiões geopolíticas de produtores e consumidores de petróleo, por isso, ex-União Soviética [7].

Tabela 1. Demanda mundial de petróleo, de 2010 a 2012, milhões de barris por dia.

	África	Américas	Ásia/Pacífico	Europa	Ex-União Soviética	Oriente Médio	Mundo
2010	3,4	30,1	27,3	15,3	4,4	7,8	88,3
2011	3,4	30,0	28,0	15,0	4,7	8,0	89,1
2012	3,5	30,0	28,7	14,6	4,8	8,2	89,9

De 2010 a 2011, a demanda passou de 88,3 a 89,1 milhões de barris por dia, e em 2012, a previsão chega a 89,9 mbd. São apontadas como causas deste aumento constante na demanda de petróleo nos últimos anos: o pós-tsunami no Japão, o clima frio na Rússia, Índia e Coreia do Sul, e a demanda industrial. Este último fator é o mais impactante, por ser global e estar diretamente ligado ao crescimento e desenvolvimento da população, condições que tendem a aumentar [7].

A Tabela 2 apresenta a demanda por produto de petróleo no período de 2010 e 2012, desde a nafta ao gás liquefeito de petróleo (GLP), em países que não participam da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), um grupo de 34 países dedicados ao desenvolvimento global; os dados incluem o Brasil, país não membro de colaboração [8]. Observa-se que óleo diesel é o mais consumido, com média de 13,5 mbd. A variação de 2011 a 2012 diminui de 4,7 a 3,6% devido ao aumento na demanda do biodiesel, produto natural de concorrência direta. A diminuição de fontes de combustíveis fósseis (não renováveis) e a adoção de novas fontes energéticas por países importadores de petróleo na

intenção de reduzir a dependência por este produto, reforçam a queda nos números e abre espaço para a utilização do biodiesel no lugar do diesel de petróleo. Na última linha da tabela, “Outros produtos” se refere, por exemplo, ao betume para pavimentação asfáltica e ao óleo cru [7]. A variação é a diferença entre os valores do ano atual e do ano anterior, em milhões de barris por dia (mbd).

Tabela 2. Demanda mundial por produto e variação de 2011 a 2012, milhões de barris por dia.

Produto	Demanda [mbd]			Variação [mbd]		Variação [%]	
	2010	2011	2012	2011	2012	2011	2012
GLP & Etano	4,734	4,969	5,095	0,235	0,126	5,0	2,5
Nafta	2,680	2,651	2,670	-0,029	0,019	-1,1	0,7
Gasolina	8,081	8,365	8,636	0,284	0,271	3,5	3,2
Querosene & combustível de avião	2,637	2,726	2,781	0,089	0,056	3,4	2,1
Óleo diesel	12,944	13,547	14,035	0,604	0,487	4,7	3,6
Óleo combustível residual	5,469	5,505	5,577	0,036	0,072	0,7	1,3
Outros produtos	5,621	5,725	5,955	0,104	0,230	1,8	4,0
Total	42,167	43,488	44,750	1,322	1,261	3,1	2,9

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) mantém um controle dos produtores nacionais de biodiesel desde 2005, em que se verifica um aumento constante da produção, como mostram as Tabela 3 e 4 e a Figura 2 [9]. Na Tabela 3, tem-se o número de barris produzidos mês a mês, partindo de 49 barris em março de 2005 a mais de 1,36 milhões de barris em dezembro de 2011.

Tabela 3. Produção anual de biodiesel no Brasil, em barris.

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Janeiro	-	6763	107611	482961	568300	927338	1171966
Fevereiro	-	6562	106504	484851	504597	1119900	1111935
Março	49	10849	142382	400534	830203	1346965	1468451
Abril	82	11231	118078	404749	663312	1162968	1260361
Mai	162	16213	163565	478020	652020	1275127	1386805
Junho	143	40823	170818	646384	887738	1289035	1456551
Julho	45	20950	168054	677956	972133	1304720	1571808
Agosto	359	32088	276493	688952	1050942	1453952	1559463
Setembro	13	42364	289416	831882	1009755	1383683	1471639
Outubro	213	53976	337188	797658	986311	1257303	1496255
Novembro	1769	100794	354750	742290	1045319	1307451	1491876
Dezembro	1794	91398	308300	704793	946225	1181581	1364074
Total	4630	434010	2543158	7341030	10116855	15010023	16811185

De 2007 a 2009, o total de biodiesel produzido no Brasil praticamente quadruplicou: passou de cerca de 2,5 milhões de barris a mais de 10 milhões. Esse aumento ocorreu devido às medidas do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) para inclusão de biodiesel em óleo diesel: de janeiro a junho de 2008, como mistura a 2% em volume, chamado diesel B2; entre julho de 2008 e junho de 2009, como mistura a 3% (B3), de julho a dezembro de 2009

como mistura à 4% (B4). No início de 2010 uma nova medida estipulou que o biodiesel deveria ser adicionado ao diesel de petróleo na proporção de 5% em volume, obrigatório a partir de 2013. A produção já crescente continua aumentando, chegando ao total de 16,8 milhões de barris no ano de 2011.

A Figura 2 apresenta os mesmo dados da Tabela 3 em gráfico de barras, de 2005 a 2011. Observa-se que cada ano supera o anterior em todos os meses, mesmo havendo oscilações dentro de um mesmo ano.

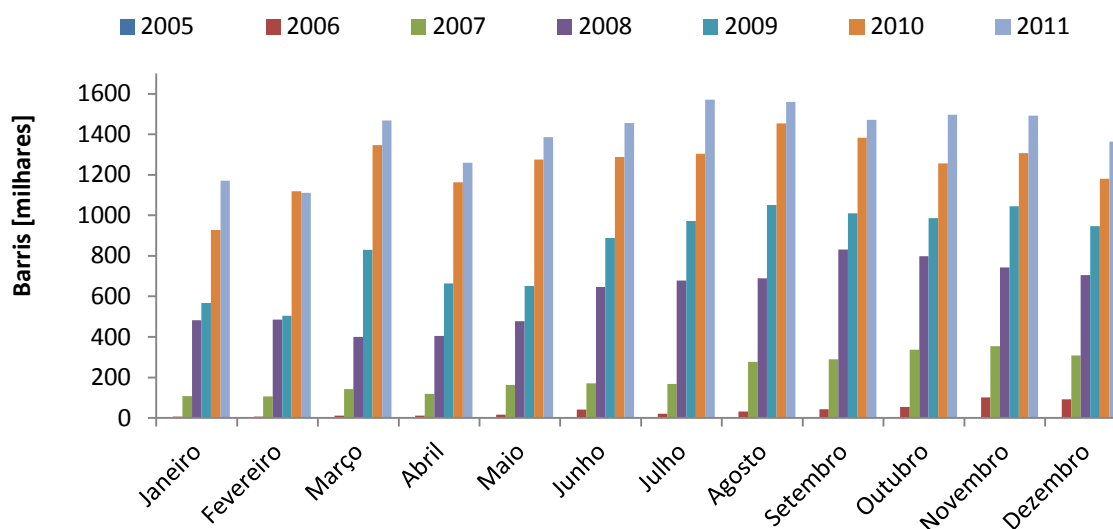


Figura 2. Produção mensal de biodiesel de 2005 a 2011.

Como se observa na Tabela 4, o ritmo crescente de produção de biodiesel está sendo mantido, com mais de um milhão de barris por mês em 2012.

Tabela 4. Produção mensal de biodiesel em 2012, dados em barris, com variação acumulada.

	Variação do acumulado no ano	
	2012	2012 / 2011 (%) ^a
Janeiro	1213976	3,6
Fevereiro	1349840	12,3
Março	1389245	5,3
Abril	1077233	0,4
Maio	1236066	-2,1
Junho	1260723	-4,2
Julho	1352732	-5,8
Total	8879813	

^a Variação percentual do somatório dos valores desde o mês de janeiro até um determinado mês do ano de 2012, em relação ao somatório do mesmo período do ano de 2011.

Considerando que para cada 90,0 m³ de biodiesel produzidos, tem-se 10,0 m³ de glicerina [10], pela Tabela 4, estima-se um total de 986,6 mil m³ de glicerina produzidos até julho de 2012. A maioria deste volume é devidamente separada do biodiesel durante a produção, porém, permanecendo no produto, pode comprometer o funcionamento dos motores em que se utilize o biodiesel.

1.2. Glicerol

O termo glicerol aplica-se ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol, um álcool tri-hidroxilado que ocorre naturalmente na forma combinada como glicerídeo em todos os óleos graxos animais e vegetais. O termo glicerina aplica-se ao glicerol impuro e aos produtos comerciais purificados, normalmente contendo teor acima de 95% de glicerol, sendo que vários níveis estão disponíveis comercialmente [11].

A transesterificação de óleos e gorduras vegetais e animais é um dos métodos de obtenção da glicerina; variando o reagente entre base, água e álcool, obtém-se, respectivamente, sabão, ácidos graxos e ésteres alquílicos [11]. Este último produto pode ser denominado biodiesel.

A presença de glicerol no biodiesel, ligado (mono, di e triglicerídeos) e livre, pode causar problemas operacionais, como depósitos nas válvulas e injetores dos motores de combustão, entupimento de filtros, redução da capacidade do sistema de ar condicionado do veículo, e emissão de aldeídos como a acroleína que é um composto carcinogênico [12].

Para minimizar estes danos, foram criadas regulamentações como a norte-americana ASTM D 6751, a europeia EN 14214, e as brasileiras da ANP nº 42 e nº 7, que especificam o nível máximo de glicerol em biodiesel puro (B100) e em mistura de 98% de diesel e 2% de biodiesel (B2), e outras condições mínimas para comercialização do produto.

O conteúdo de glicerol total, soma do glicerol livre ao ligado (mono, di e triglicerídeos), é um indicador de qualidade, já que, pequenos valores de glicerol total garantem um alto nível de conversão da matéria-prima. A Tabela 5 apresenta os limites especificados para glicerol livre, mono, di, triglicerídeos e glicerol total, conforme as regulamentações acima [1, 13-15].

Tabela 5. Alguns componentes e valores máximos especificados por resoluções para comercialização de biodiesel em Estados Unidos, União Europeia e Brasil.

Componente	Máximo (% massa)		
	ASTM D 6751	EN 14214	ANP 7
Glicerol livre	0,02	0,02	0,02
Monoglicerídeos	Não especificado	0,8	Anotar ^a
Diglicerídeos	Não especificado	0,2	Anotar ^a
Triglicerídeos	Não especificado	0,2	Anotar ^a
Glicerol total	0,24	0,25	0,25

^a A norma não especifica limite para mono, di e triglicerídeos, pede que sejam anotadas as porcentagens mássicas obtidas.

A Resolução ANP nº 42 de 2004, estipulava um limite máximo de glicerol total de 0,38 % em massa no biodiesel, muito acima das normas europeia e norte-americana. Em 2008, com a ANP nº 7, o valor foi corrigido para 0,25 % em massa.

1.2.1. Determinação de glicerol

Os primeiros testes para determinação de glicerol livre em biodiesel foram realizados pelo método clássico do periodato, conforme ISO 2879 [16], que é utilizado até os dias atuais,

inclusive na indústria [17]. Os testes seguintes basearam-se em reações enzimáticas [18, 19], que levaram ao desenvolvimento de kits comerciais como o BPQ-02 da Sigma-Aldrich, baseado no método Greenhill, com custo de 100,00 dólares [20] e kit Bioclin Quibasa. Depois, foram relatadas as determinações por cromatografia gasosa com diferentes detectores, [21-30]. Cromatografias líquidas [6, 31-39], determinações eletroenzimáticas [40-42], fluorimétricas [43], por espectrofotometria no UV-Vis [44-47], espectroscopias de ressonância magnética nuclear e de infravermelho [48, 49], eletroforese capilar [50], titulação de hidroxilas [51] e associada à determinação do índice de refração [52] também já foram testadas com sucesso, tanto para glicerol livre como total.

A determinação eletroquímica é citada quando se utilizam biossensores enzimáticos [40-42], porém, técnicas eletroquímicas também podem ser utilizadas individualmente para determinação de glicerol livre em biodiesel [5, 12, 53], como propõe este trabalho. Várias revisões comparam diversos métodos, citando vantagens e desvantagens, como indicam as Tabelas 6 e 7 [54-58].

Tabela 6. Métodos para determinação de glicerol livre em biodiesel.

Método	Derivatização	Preparo	LD ^a	Ref.
Titulação	NaIO ₄ , C ₂ H ₄ (OH) ₂	HCl, H ₂ O	0,0009 a 3,7 % (m)	[17]
Procedimento enzimático	Não	2 g amostra + 6,0 mL HCl 0,1 mol L ⁻¹	N.C. ^b	[18]
Procedimento enzimático com detecção colorimétrica	Não	400µL amostra + 800µL etanol + 800µL água destilada + 1600µL heptano; vortex por 1 min, centrifuga por 2 min	7,10x10 ⁻⁶ % (m)	[19]
Greenhill	Não	Não	5 ppm	[20]
CG-DIC	MSTFA/ piridina	Não	N.C. ^b	[21-25]
CG-DIC/ EM	BSTFA	Não	10 ⁻⁴ / 10 ⁻⁵ % (m)	[26]
CG-DIC/ EM	BSTFA	Não	10 ⁻⁴ % (m)	[27]
CG-EM	BSTFA, TMCS, MSTFA	Não	0,04 µg mL ⁻¹	[28]
CG-DIC-EM	MSTFA	Não	0,053 % (m)	[29]
CG-DIC	MSTFA	Não	0,02 a 0,09 % (m)	[30]
CI-DAP	Não	5 g amostra + 45 g água destilada; agitação por 5 min, repouso por 5 min	0,7x10 ⁻⁴ % (m)	[6]
CLAE-DAP	Não	4g amostra + 45g água deionizada + 50mL hexano; agitação de 30 min, repouso de 2h	1µg g ⁻¹	[31]

CLAE-DIR	Não	4-20g amostra + 4,5mL água destilada, agitação por 30 min, repouso por 2h	0,0004 % (m)	[32]
CEIAE-DAP	Não	Aquosa	0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[34]
CET-DIR-DV	Não	Não	N.C. ^b	[35]
CLAE-ET-DIR	Não	Não	N.C. ^b	[36]
CPG-DIR	Não	Filtração em membrana PTFE	N.C. ^b	[38]
CFS-EM-UV-DEEL	Não	Dissolução em metanol (60 mg mL ⁻¹)	N.C. ^b	[39]
EE	Não	400 μL amostra + 800 μL água destilada + 800 μL etanol absoluto + 1600 μL heptano; vortex e centrífuga por 2 min	1,0x10 ⁻⁵ % (m)	[40]
EE	Não	400 μL amostra + 800 μL água destilada + 800 μL etanol absoluto + 1600 μL heptano; vortex e centrífuga por 2 min	0,013 % (m)	[41]
EE	Não	Não	0,1 g L ⁻¹	[42]
UV-Vis	NaIO ₄ 10mM, acetilacetona 0,2M	Extração líquido-líquido	0,5 mg L ⁻¹	[43]
UV-Vis	NaIO ₄ 10mM, acetilacetona 0,2M	1g amostra + 4mL hexano + 2mL água destilada + 2mL etanol; vortex por 5 min, centrífuga por 15 min a 2000 rpm	N.C. ^b	[44]
UV-Vis-DAD	NaIO ₄ 10 mM, acetilacetona 0,2M	Amostra+água; extração líquido-líquido, agitação, aquecimento por 30 min	0,011% (m)	[45]
Espectrofotometria- CCD	KIO ₄ 15mM, acetilacetona 1,5M	1g amostra + 4mL água deionizada; agitação orbital por 30 min, centrífuga por 5 min a 3000 rpm	0,0004 % (m)	[46]
Espectrofotometria	Não	Filtração em fase sólida	0,004% (m)	[47]
IV	Não	Não	0,01 % (m)	[48]
IV	Não	Não	N.C. ^b	[49]
EC-DAD	NaIO ₄ 900 mg L ⁻¹ e NaNO ₃ 100 mg L ⁻¹ (PI)	200 mg amostra + 800 mg água deionizada + 200 μL clorofórmio; vortex por 10 min, centrífuga por 15 min a 2000 rpm	4,3 mg L ⁻¹	[50]

Titulação	NaIO ₄ , KIO ₄	Não	N.C. ^b	[51]
VC	Não	2 g de amostra + 6,0 mL água; vortex por 5 min, centrífuga por 10 min; filtração em C18	2,3 mg L ⁻¹	[5]
VC	Não	2 g de amostra livre + 10, 20 ou 100 µL de glicerol 1,0 g L ⁻¹	0,033 mmol L ⁻¹	[53]
Amperometria-FIA	Não	250 mg amostra + 5,0 mL água; vortex por 5 min, centrífuga por 10 min	5 mg kg ⁻¹	[12]

^a0,02% = 200 ppm = limite máximo permitido de glicerol livre

^bN.C.: Não consta;

CCD: Detector multicanal de fótons; CEIAE: Cromatografia de exclusão iônica de alta eficiência; CFS: Cromatografia de fluido supercrítico; CG: Cromatografia gasosa; CI: Cromatografia de íons; CLAE(-ET): Cromatografia líquida de alta eficiência (por exclusão de tamanho); CPG: Cromatografia de permeação em gel; DAD: Detector de arranjo de diodos; DAP: Detecção por amperometria pulsada; DEEL: Detector evaporativo de espalhamento de luz; DIC: Detector de ionização em chama; DIR: Detector de índice de refração; DV: Detector viscosimétrico; EC: Eletroforese capilar; EE: Enzimático-eletroquímico; EM: Espectrometria de Massa; IV: Espectrometria no infravermelho próximo; UV: Detector ultravioleta; UV-Vis: Espectrofotometria ultravioleta-visível; VC: Voltametria cíclica.

Tabela 7. Métodos para determinação de glicerol total em biodiesel

Método	Derivatização	Preparo	LD ^a	Ref.
Titulação	CH ₃ NaO, NaIO ₄ , C ₂ H ₄ (OH) ₂	HCl, H ₂ O	0,0046 a 5,15 % (m)	[17]
Procedimento enzimático	Saponificação	Fase sólida C8	N.C. ^b	[18]
Procedimento enzimático com detecção colorimétrica	Transesterificação	0,5g biodiesel + 2,0mL água destilada + 2,0mL heptano; vortex por 1 min, centrífuga por 2 min	7,10 x 10 ⁻⁶ % (m)	[19]
Greenhill	Saponificação	Não	75ppm	[20]
CG-DIC	MSTFA	Não	N.C. ^b	[25]
CG-DIC-EM	MSTFA	Não	2,458 %(m)	[29]
CG-DIC	MSTFA	Não	0,15 a 0,69 %(m)	[30]
CI-DAP	Saponificação	5 g amostra + 45 g água; agitação por 5 min, repouso por 5 min	0,7 x 10 ⁻⁴ % (m)	[6]
CLAE, UV-Vis	9,9-dimetoxifluoreno	Não	0,05 % (m)	[33]
CEIAE-DAP	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	Aquosa	0,5 µg kg ⁻¹	[34]

CLAE-ET-DEEL	Não	Não	0,1 µg	[37]
EE	Transesterificação	0,1 g amostra + 3,9 mL água destilada + 5,0 mL heptano; vortex, centrifuga por 2 min	$1,0 \times 10^{-5}$ % (m)	[40]
UV-Vis	Saponificação; NaIO ₄ 10mM, acetilacetona 0,2M	Extração líquido-líquido	1,4 mg L ⁻¹	[43]
UV-Vis-DAD	Saponificação; NaIO ₄ 10 mM, acetilacetona 0,2 M	Amostra+água; extração líquido-líquido, agitação, aquecimento por 30 min	0,064 % (m)	[45]
Titulação de hidroxilas	Transesterificação, acetilação	Não	N.C. ^b	[52]
Índice de refração	Transesterificação, acetilação	NaCl	N.C. ^b	[52]

^a0,02% = 200 ppm = limite máximo permitido de glicerol livre

^bN.C.: Não consta;

CEIAE: Cromatografia de exclusão iônica de alta eficiência; CG: Cromatografia Gasosa; CI: Cromatografia de íons; CLAE(-ET): Cromatografia líquida de alta eficiência (por exclusão de tamanho); DAD: Detector de arranjo de diodos; DAP: Detecção por amperometria pulsada; DEEL: Detector evaporativo de espalhamento de luz; DIC: Detector de ionização em chama; EE: Enzimático-eletroquímico; UV: Detector ultravioleta; UV-Vis: Espectrofotometria ultravioleta-visível.

1.3. Técnicas eletroquímicas

Técnicas eletroquímicas são dedicadas à interface entre eletricidade e química, especificamente, à medir quantidades elétricas como corrente, potencial ou carga, e suas relações com parâmetros químicos. Tal uso de medições elétricas para fins analíticos encontrou aplicações em várias áreas, como monitoramento ambiental, análises biomédicas e controle de qualidade industrial [59, 60].

Processos eletroquímicos, ao contrário da maioria das análises químicas que envolvem soluções homogêneas, ocorrem na interface eletrodo (condutor) - solução (eletrólito). A superfície do eletrodo é então uma junção entre um condutor eletrônico e um iônico. São necessários dois tipos de eletrodos: um responde ao analito de interesse e é denominado eletrodo de trabalho (ET), o outro, denominado eletrodo de referência (ER), tem um potencial constante independente das propriedades do eletrólito [59, 60].

Os processos de transferência de carga na interface eletrodo - solução promovem oxidações e reduções forçadas das espécies químicas em solução, assim, a corrente resultante reflete a taxa com que os elétrons se movem através da interface, a taxa de oxidação ou redução das espécies eletroativas. As vantagens são: alta sensibilidade, seletividade para espécies eletroativas, ampla faixa linear de concentração, instrumentação portátil e de baixo custo, capacidade de especiação e uma diversidade de eletrodos. Também são obtidos limites de detecção excepcionalmente baixos (10^{-13} a 10^{-15} mol L⁻¹) e uma variedade de informações

como: estequiometria, velocidade de transferência de carga interfacial e de massa, entre outras, que caracterizam e descrevem eletroquimicamente os sistemas [59-61].

1.3.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é a técnica eletroquímica utilizada para obtenção de informações qualitativas sobre reações eletroquímicas, sendo geralmente a primeira medição feita nos estudos eletroanalíticos. Permite obter informações rápidas sobre a localização de potenciais redox das espécies eletroativas, a reversibilidade do processo, o número de elétrons envolvidos, se há ou não a formação de espécies intermediárias, avaliar convenientemente o efeito do eletrólito no processo redox, entre outras.

A técnica consiste no escaneamento linear de potencial num eletrodo de trabalho, usando uma forma de onda de potencial triangular, como mostra a Figura 3A. Durante a variação de potencial, mede-se a corrente resultante do potencial aplicado, obtendo-se um voltamograma cíclico, gráfico que relaciona corrente e potencial, como mostra a Figura 3B. Dependendo da resposta desejada, ciclos únicos ou múltiplos podem ser aplicados [59-61].

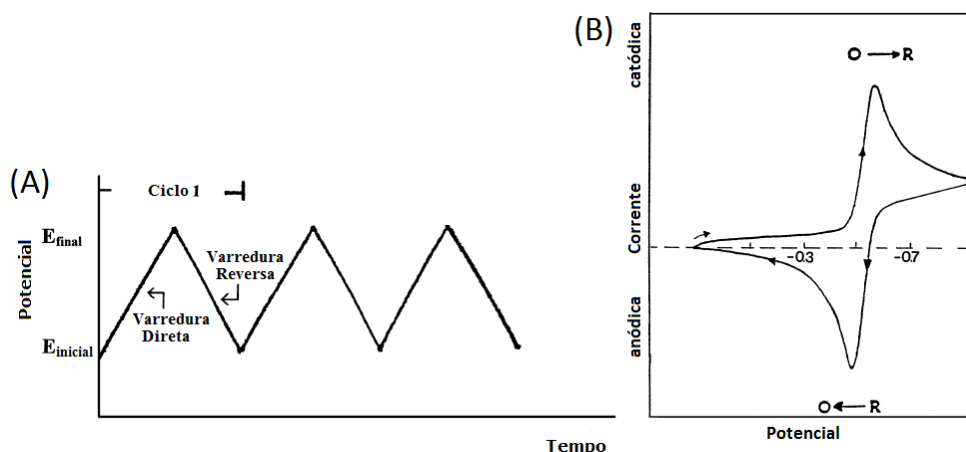


Figura 3. Forma de onda de potencial triangular variando com o tempo (A), e voltamograma cíclico típico para um processo redox reversível (B) [59].

Para realização da medida, os eletrodos de trabalho e de referência são montados na célula eletroquímica junto a um eletrodo auxiliar (EA), também chamado contra-eletrodo, responsável por fechar o circuito elétrico e permitir a passagem de corrente. Estes eletrodos devem estar imersos no eletrólito que garante o controle difusional das espécies eletroativas. Os três eletrodos são conectados a um potenciostato que aplica potenciais num intervalo pré-definido e faz a aquisição do sinal de corrente [62].

1.3.2. Amperometria

A amperometria é uma técnica em que se aplica um potencial constante e mede-se a corrente correspondente ao longo do tempo, relacionando a corrente à concentração. Um potenciostato registra os pontos em uma região selecionada do perfil corrente-potencial [61].

Pode ser utilizada para especiação em amostras com diferentes tipos de metais, em meios aquosos [63] e não aquosos [64]; na detecção de aminoácidos em amostras orgânicas

[65], de compostos quirais [66], de DNA [67]; como método comparativo de técnicas como titulação [68] e gravimetria [69], entre outras; em análises batelada ou em fluxo [69-71]; na detecção simultânea de dois ou mais analitos [72]; com biossensores como eletrodo de trabalho [40-42, 73], entre outros.

1.3.2.1. Amperometria a potencial constante

Na detecção amperométrica a potencial constante, ou simplesmente amperometria fixa, um potencial é aplicado no eletrodo de trabalho promovendo a oxidação ou redução da espécie analítica em solução.

Uma limitação é a falta de repetitividade e reprodutibilidade devido à possível adsorção de subprodutos e/ou impurezas na superfície do eletrodo. Também podem ser registrados sinais eletroquímicos de subprodutos de reações que interfiram no sinal de interesse. Para a obtenção de resultados reprodutíveis, a superfície do eletrodo deve ser limpa com frequência, quer por polimento mecânico ou por limpeza eletroquímica [74].

Estratégias para promover a limpeza da superfície do eletrodo de trabalho ou impedir sua contaminação incluem adição de EDTA ao eletrólito suporte [74, 75], uso de eletrodos modificados [65, 72, 73, 76], ou regeneração constante da solução na superfície do eletrodo [70, 71, 74]. Para regeneração da superfície do eletrodo a agitação é amplamente utilizada. Forçar a movimentação da solução faz com que o analito fique em contato com o eletrodo durante curto período de tempo, prolongando o tempo de uso do mesmo já que a contaminação demora mais a acontecer. A agitação pode ser feita em batelada, ou pode-se utilizar um sistema de fluxo que mantenha o eletrólito com uma vazão constante na superfície do eletrodo e permita que pequenos volumes da amostra sejam injetados no fluxo (ordem de μL). O sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) apresenta tais características.

1.3.2.2. Amperometria de múltiplos pulsos

Na amperometria a potencial constante não há a possibilidade de determinação simultânea de compostos eletroativos em diferentes potenciais, ou de diferenciação do analito de interferentes. Para melhor resolução na análise, utiliza-se a técnica de amperometria de múltiplos pulsos (AMP).

Considerando dois analitos, por exemplo, no primeiro potencial tem-se a oxidação ou redução de apenas uma das espécies eletroativas, com sinal de corrente proporcional à concentração; no segundo potencial, de maior energia, ambas as espécies analisadas sofrem oxidação ou redução. Assim, pela diferença entre os sinais de corrente obtidos nos dois potenciais, determina-se a concentração da segunda espécie. Outra possibilidade seria a utilização de dois eletrodos específicos em paralelo, um para cada analito, sendo necessário um bipotenciostato para controlar cada eletrodo de trabalho [72]. O sinal de corrente obtido ao longo do tempo é denominado amperograma.

A técnica de AMP permite a aplicação simultânea de até dez potenciais diferentes com pulsos de curta duração (milissegundos), conforme limite do equipamento. A utilização de

vários potenciais caracteriza uma limpeza eletroquímica, conferindo alta precisão, principalmente se associada à um sistema de fluxo.

1.4. Eletrodo de trabalho

Um eletrodo de trabalho ideal responde de forma rápida e reprodutível às mudanças do equilíbrio do analito. A convecção forçada (agitação) é usualmente utilizada para aumentar a sensibilidade e reprodutibilidade destes eletrodos. Suas superfícies podem ser modificadas por eletrodeposição ou modificação química, esta, mais comum em eletrodos de carbono.

Eletrodos metálicos, do tipo redox, em que um metal inerte atua como doador ou receptor de elétrons da reação em análise, geralmente são feitos de ouro, platina ou paládio [77]. Uma vantagem geral deste tipo de eletrodo metálico é que a alta condutividade dos metais resulta em baixas correntes de fundo, de 10^{-3} a 10^{-6} A, sendo também de fácil construção e polimento. Como desvantagem, alguns metais podem perder a inércia química, sofrendo corrosão ou passivação, de acordo com as condições experimentais utilizadas [61].

1.4.1. Eletrodos de ouro e platina

A utilização de ouro ou platina na construção dos eletrodos de trabalho metálicos permite ótima cinética de transferência de elétrons e alcance de altos potenciais anódicos, apesar do baixo potencial de evolução do hidrogênio limitar o potencial catódico. Correntes de fundo de intensidade suficiente para atrapalhar o sinal do analito podem ser verificadas caso ocorra a formação de óxidos de superfície ou a adsorção de camadas de hidrogênio em filmes que podem alterar a cinética de transferência de elétrons. Essa alteração na cinética fornece dados irreprodutíveis, sendo necessário o uso de ciclos de limpeza e reativação da superfície do eletrodo. Comparado à platina, eletrodos de ouro são mais inertes, menos suscetíveis à formação de filmes de óxidos estáveis ou à contaminação da superfície [59].

1.4.1.1. Comportamento eletroquímico do glicerol

O comportamento eletroquímico de alcoóis em eletrodos de ouro ou platina e os problemas relacionados à eletro-oxidação dos mesmos são bem conhecidos [78, 79]. É conhecido que moléculas de alcoóis adsorvidos são oxidadas em todos os potenciais aplicados, e o produto gerado depende unicamente do potencial aplicado e do pH do eletrólito. Em potenciais próximos da evolução de oxigênio, uma oxidação dissociativa de glicerol ocorre, levando a formação de ácido fórmico, ácido oxálico e ácido glicólico. Quando o potencial é fixado por volta de 0,75V contra eletrodo de referência de hidrogênio (ER-H), gliceraldeído é produzido [80].

Os mecanismos propostos na oxidação de alcoóis envolvem radicais hidroxila adsorvidos, que participam na etapa de transferência de oxigênio. Apesar de eletrodos de ouro já terem densidades de corrente relativamente altas em meio alcalino, técnicas eletroquímicas mostram que a densidade de corrente aumenta com o número de grupos hidroxila adjacentes, devido ao aumento da área de superfície polar, o que favorece a eletrodeposição destas moléculas em eletrodos de ouro [78, 80, 81]. No caso específico do

glicerol, tem-se uma densidade de corrente de cerca de 20 mA cm^{-2} para concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C , meio básico; a eletro-oxidação deste álcool envolve a interação entre glicerol adsorvido e espécies hidroxila adsorvidas na superfície do eletrodo de ouro, formando espécies AuOH que são responsáveis pelo início da oxidação do analito, ou seja, sem as espécies AuOH não há oxidação de glicerol [82].

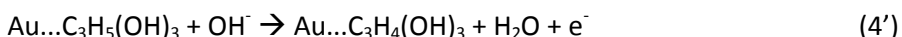
O mecanismo foi apresentado primeiramente em 1984, numa sequência de quatro reações, apresentadas abaixo, sendo M a superfície metálica do eletrodo, G representando glicerol, o subscrito “ads” indicando que a substância está adsorvida [83]. Este mesmo mecanismo foi confirmado para o eletrodo de ouro em 1991 [82].



Para a oxidação de glicerol em meio básico em platina, a adsorção tem papel importante, sendo a etapa limitante do processo de oxidação a reação (3) do mecanismo acima [83]:



No caso da oxidação em ouro, tem-se a alteração da ordem das reações (1) e (2), sendo necessária a formação de AuOH para iniciar a oxidação do glicerol. Se a variação de potencial é realizada no sentido negativo, a adsorção de espécies hidroxila não afeta a cinética do processo e na sequência de reações de (1) a (4) do mecanismo proposto acima, a reação (4) é a etapa lenta do processo, seguida da oxidação do produto desidrogenado [83]:



1.4.2. Eletrodo de carbono vítreo

O carbono existe em várias formas alotrópicas, várias delas, condutoras e usadas no arranjo de eletrodos de trabalho. O uso deste tem se expandido devido a características como larga janela de potencial, baixa corrente de fundo, baixo custo, facilidade de modificação de arranjo e superfície, inércia química e aplicação como sensor ou detector. Apesar de a transferência eletrônica ser menor e mais lenta que em eletrodos metálicos, dependendo da estrutura e preparo da superfície, as possibilidades são mais variadas em eletrodos de carbono, sendo os materiais mais utilizados: carbono vítreo, faixas de carbono impresso, grafite, fibras, filmes e compósitos de carbono [59, 61].

A isotropia, a homogeneidade de propriedades em todo o material, faz do carbono vítreo o material mais utilizado para eletrodos. Também possui excelentes propriedades mecânicas e elétricas, ampla janela de potencial, inércia química, e performance relativamente reprodutível. A reprodutibilidade é melhorada com pré-tratamento da superfície, obtendo-se eletrodos ativos, com alto desempenho analítico; o pré-tratamento é geralmente realizado pelo polimento da superfície espelhada com partículas de alumina umedecidas [59, 61]

1.4.2.1. Filme de hexacianoferrato de óxido de rutênio

A modificação em eletrodos consiste na utilização de reagentes específicos para conceder o comportamento daquele reagente ao eletrodo, pela modificação da estrutura, das partículas constituintes ou apenas da superfície. Pode ser realizada de forma química, pela ligação definitiva do modificador à superfície do eletrodo, ou física, sendo o modificador colocado sob o eletrodo, na forma de um filme, por exemplo, de forma que a superfície do eletrodo atue como fonte ou receptor de elétrons. A modificação de um eletrodo com ótimas propriedades como o eletrodo de carbono vítreo só tende a melhorar suas características.

O hexacianoferrato de ferro (III), comumente conhecido como Azul da Prússia, tem recebido especial atenção na área de sensores e biossensores devido ao seu poder eletrocatalítico na redução eletroquímica de H_2O_2 em potenciais em torno de 0,0 V (vs. Ag/AgCl), o que garante alto nível de seletividade ao sensor [84, 85].

No entanto, eletrodos modificados com este hexacianoferrato apresentam baixa estabilidade frente ao emprego de métodos analíticos em fluxo [86]. Análogo ao Azul da Prússia, o hexacianoferrato de óxido de rutênio (RuOHCF) teve suas propriedades eletrocatalíticas exploradas para a determinação de aminoácidos contendo enxofre (cisteína, metionina e cistina) [87], ácido ascórbico [88, 89], deoxiguanosina [90, 91], H_2O_2 [85] e ranitidina [92]. Para todos os analitos, como padrão ou em amostras, obteve-se linearidade na resposta eletroanalítica e limites de detecção de micro a nanomol por litro.

O filme de RuOHCF já foi estudado quanto à influência da composição do eletrólito suporte no perfil voltamétrico do filme, quanto ao efeito do pH, tal que, quanto maior a acidez do meio, maior é o deslocamento dos quatro picos para potenciais mais positivos (faixa de pH entre 0,5 e 3,0). Apesar dos mecanismos de formação do filme de RuOHCF não serem bem conhecidos, suas propriedades eletrocatalíticas são significativas [93].

1.4.3. Eletrodo de diamante dopado com boro

Apesar de diamante ser um conhecido isolante, filmes de diamante dopado com boro possuem propriedades eletrônicas que variam de semicondutor a metal, conforme a quantidade de boro. Tais propriedades incluem uma ampla janela de potencial, chegando a 3,0 V, acima do potencial de evolução de oxigênio, devido à natureza quimicamente inerte da superfície de diamante; corrente de fundo baixa e estável, mínima adsorção de compostos orgânicos, boa reatividade eletroquímica sem necessidade de pré-tratamento, baixa sensibilidade a oxigênio dissolvido, alta dureza, isto é, alta resistência mecânica.

Portanto, eletrodos de diamante dopado com boro permitem análises sob condições extremas, incluindo altos potenciais anódicos, surfactantes misturados ao eletrólito ou qualquer meio agressivo, polarização em meio ácido, transporte de massa acelerado e cavitação interfacial induzida por ultrassom de potência [59, 94].

1.4.4. Eletrodos compósitos de grafite

Um compósito resulta da combinação de dois ou mais materiais diferentes. Cada componente individual possui uma característica original enquanto o material compósito distingue em suas características químicas, mecânicas e físicas das apresentadas pelos componentes individuais [95].

As propriedades elétricas do compósito dependem da natureza de cada componente, suas quantidades relativas e sua distribuição. A resistência elétrica é determinada pela conectividade das partículas condutoras na matriz polimérica. Isto significa que essas frações podem ser estudadas para determinar a melhor composição. Já quando um material isolante age somente como agente aglutinante, isto é, agregando as partículas do material condutor, o compósito pode ser classificado pela natureza do material condutor, tamanho e arranjo de partículas.

Materiais condutores, como o carbono, em suas várias formas alotrópicas e granulares, são misturados a polímeros orgânicos isolantes como PVC [96, 97], Teflon [98, 99], polietileno [100], poliestireno [101], adesivo epóxi [102, 103], Nafion [104], entre outros, obtendo-se compósitos de grafite.

Eletrodos compósitos de grafite e adesivo epóxi (AE) apresentam como fase condutora o grafite e como fase polimérica um polímero orgânico isolante. Em geral, estes compósitos apresentam uma alta estabilidade mecânica e química, além de um baixo custo. Compósitos mistos de carbono com metais (em escala micro e nanométrica) e o polímero isolante podem ser encontrados facilmente na literatura [105].

O grafite é um alótropo do carbono, composto de extensas camadas de átomos de carbono sp^2 , que formam folhas com anéis unidos. Entre os planos das folhas existem elétrons π deslocalizados, o que lhe confere uma boa condutividade [106], mas limitada quando comparada a condutividade dos metais.

O adesivo epóxi (Araldite® Professional 90 min, Brascola Ltda) é composto pela resina epóxi (líquido branco acinzentado) e pelo endurecedor (líquido amarelado). A mistura destes dois componentes é feita pela relação 1:1, sendo possível manuseá-la durante aproximadamente 90 minutos e o tempo total de cura da mistura é de 24 horas à temperatura ambiente, quando isenta de solventes. Depois de curado, este adesivo resiste a uma temperatura de 80°C [107].

As resinas tipo epóxi são polímeros constituídos por monômeros ou pré-polímeros que reagem com agentes de cura produzindo plásticos termorresistentes e de alta eficiência. Os agentes de cura (endurecedores) mais utilizados, para converter epóxios em termoplásticos, são os anidridos, as polimercaptanas, as aminas, as poliamidas, entre outros [108].

A primeira resina comercial foi a diglicidil-éter de bisfenol A, que tem como polímero o bisfenol A, e é até hoje a mais comum e mais barata conhecida. No entanto, têm sido comercializadas resinas epóxi com base em vários outros polímeros, como por exemplo, o bisfenol F, a epicloriglicina, o tetrabromobisfenol A e o poliglicol. Conforme a composição da resina epóxi, que pode também ser uma mistura entre resinas, pode-se obter características

desejáveis como resistência mecânica (rigidez ou flexibilidade), química (reatividade ou inércia) e térmica [108]. De forma geral, pode-se dizer que, quanto maior a massa molecular do polímero, mais sólida se torna a resina.

Convencionalmente, após a mistura com o endurecedor, durante a cura, os adesivos epóxis transformam-se de líquidos de baixa viscosidade em resinas sólidas bem rígidas, devido à formação de ligações cruzadas entre os sítios do polímero da resina epóxi e as cadeias terminais dos endurecedores. A estrutura da resina epóxi, além da proporção da mistura com o endurecedor, define o número de ligações cruzadas entre eles [108]. Quanto maior o número destas ligações, maior a resistência mecânica do polímero resultante.

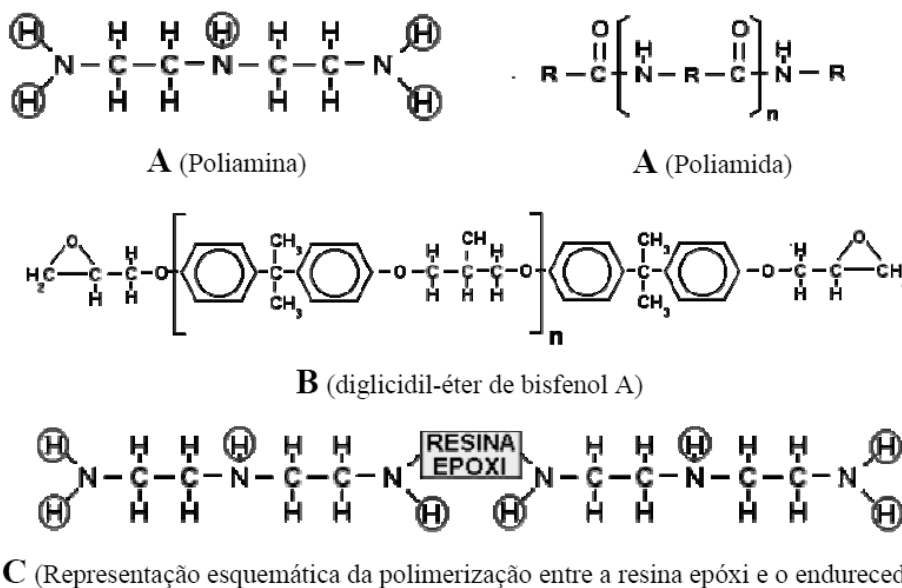


Figura 4. Estruturas dos componentes básicos do adesivo epóxi (A e B) e representação das suas ligações cruzadas (C) [108].

Sobre o adesivo epóxi (AE) utilizado, o endurecedor é composto de poliaminamidas. Estes agentes de cura são provenientes de uma reação de poliamida com excesso de amina, o que faz com que o produto tenha características entre uma poliamida e uma amina alifática. Ela é adequada para casos onde se queira maior tenacidade e adesividade com melhor fluidez e maior reatividade [108].

Nos compósitos de grafite e AE, as partículas de grafite preenchem os espaços entre as ligações. O tempo de cura dos componentes do adesivo e a distribuição das partículas de grafite são dependentes da velocidade de secagem do solvente.

Informações detalhadas sobre eletrodos compósitos de grafite, como preparação, uso e propriedades estão disponíveis na literatura. Vantagens comumente citadas no uso de compósitos como materiais de eletrodo incluem: facilidade de preparo e regeneração da superfície, preparação de um eletrodo com boa resistência mecânica, resistência a solventes não aquosos, relativo baixo custo de produção, boa durabilidade [95, 102, 109, 110].

Tem-se observado o crescente uso de compósitos de grafite e adesivo epóxi para diversas finalidades analíticas, como na fabricação de eletrodo convencionais para análise de amostras de fármacos e drogas [111], dispositivos com arranjo de microeletrodos de grafite para a análise de amostras reais [102, 112], suporte para a formação de filmes metálicos “in

situ” para análise de metais a níveis de traço [103, 113], suporte para modificações da superfície na fabricação de biossensores específicos para amostras de interesse biológico [114], entre outros.

1.5. Separação de glicerol do biodiesel

Vários métodos de determinação de glicerol, livre ou total, em biodiesel exigem um preparo da amostra, como apresentado nas Tabelas 6 e 7. Na cromatografia gasosa é muito comum realizar a reação de sililação [22-28], outras técnicas apenas extraem o glicerol livre da mistura de ésteres alquílicos, como separação por cromatografia de exclusão [35-37] ou extração líquido-líquido com água, metanol e/ou hexano [115], por exemplo; para determinar o glicerol total, realiza-se transesterificação ou saponificação antes da etapa de extração .

O método de extração líquido-líquido é dos mais simples, sendo utilizados sistemas como: água e heptano [19], água e hexano [31]; água, etanol e heptano [40, 41]; mistura água e álcool e hexano [44]; água e clorofórmio [50] ou apenas água [5, 6, 12, 32, 45, 46]. A escolha de água como principal solvente de partição se deve à total miscibilidade entre esta e glicerol, à sua fácil obtenção e abundância.

1.6. Sistema em fluxo

Os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) tiveram sua proposta e desenvolvimento inicial a partir da combinação de características de métodos analíticos já existentes como técnicas eletroquímicas, espectroscopia de absorção atômica, espectrofotometria, fluorescência, quimiluminescência; e também do aperfeiçoamento do método de análise em fluxo segmentado [116, 117]. Em pouco tempo, mostrou-se uma ferramenta muito útil para diversas determinações analíticas.

A técnica foi desenvolvida por Růzicka e Hansen em 1975 e tornou-se uma das mais populares técnicas analíticas para aplicação dentro de um curto período de tempo devido a diversas vantagens, como simplicidade na instrumentação, economia no consumo de amostra e reagente, possibilidades de eliminação de contaminação, diminuição da manipulação das amostras por parte do analista, melhor precisão, diminuição do custo operacional e aumento na velocidade de processamento [74].

O processo de análise pode ser dividido em três partes: propulsão dos fluidos, injeção da amostra e detecção. Para propulsão, bombas peristálticas são comumente utilizadas por possuir torque suficiente para manter a vazão constante, mesmo se houver alteração de sentido, por exemplo [118]. O ruído na linha base em análises voltamétricas e amperométricas devido à pulsação provocada pelos roletes de propulsão [119] pode ser amenizado pelo uso de amortecedores de pulsos, ou a utilização de bombas que fornecem vazão de forma constante, como bombas tipo seringa [70, 120] ou gravidade [121, 122]. Entre estas opções, o uso da gravidade é inconveniente quando se deseja alterar de um valor preciso a outro, o que é facilmente realizado numa bomba peristáltica.

A segunda parte do sistema FIA é o injetor, cuja função é introduzir um volume definido e reprodutível de uma amostra em um fluxo de reagente ou de um transportador

adequado. Os tipos mais comuns são o de válvula rotatória desenvolvido por Růzicka e Hansen [123] e o desenvolvido pelo grupo do CENA/USP [124]. Este último é constituído por três peças de acrílico, sendo duas fixas e uma peça central que se movimenta de modo a permitir a coleta e a inserção de amostra no percurso analítico. A última parte é a detecção analítica, sendo utilizadas técnicas eletroquímicas [125], de absorção atômica [126, 127], fluorescência [128], quimiluminescência [129-131], entre outras.

O sistema FIA acoplado à AMP representa uma alternativa para determinar simultaneamente duas espécies eletroativas usando um único eletrodo. A amperometria em fluxo (AMP-FIA), como é chamado o acoplamento destas técnicas, aplica ciclos de potencial pulsado que permitem a limpeza e reativação da superfície do eletrodo, com a remoção de camadas de hidrogênio adsorvido ou óxido formados na superfície [59, 132] e reduzem a contaminação do eletrodo [74]. Assim, é possível desenvolver metodologias de análise de baixo custo, boa reprodutibilidade, boa seletividade, boa sensibilidade, menor tempo de análise e simplicidade de execução.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é desenvolver um método eletroanalítico para a determinação de glicerol em biodiesel empregando sistema de análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica em eletrodo de ouro. Os métodos empregados atualmente, inclusive o método padrão de cromatografia gasosa, são demorados e dispendiosos, comparados à métodos eletroquímicos. O eletrodo de ouro permite a detecção direta de glicerol em meio aquoso, sendo a extração líquido-líquido suficiente para separar glicerol de biodiesel.

1.7.2. Objetivos Específicos

Determinar o perfil eletroquímico de glicerol em eletrodo de ouro utilizando técnicas voltamétricas e amperométricas;

Otimizar as condições da determinação eletroquímica de glicerol em eletrodo de ouro, com a definição dos melhores parâmetros de análise em voltametria e amperometria, para determinação qualitativa e quantitativa do analito;

Comparar a determinação quantitativa de glicerol em eletrodo de ouro em sistema batelada e em sistema de análise por injeção em fluxo;

Determinar glicerol em amostras de biodiesel utilizando eletrodo de ouro, definindo as etapas de conservação e preparo de amostra e extração do analito;

Comparar os resultados obtidos em eletrodo de ouro com outros eletrodos e eletrólitos para determinação quantitativa de glicerol por técnicas eletroquímicas.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e preparo de soluções

Os reagentes utilizados no preparo de soluções foram: glicerol PA ACS redestilado, 95% (Reagen - Quimibrás), hidróxido de sódio PA ACS (Dinâmica), ácido perclórico PA, 70% (Impex - ASP Labor), ácido sulfúrico PA ACS (LabSynth), ácido acético glacial (Carlo Erba - Analyticals), acetato de sódio anidro (LabSynth), ácido fosfórico PA orto-xaroposo (Reagen - Quimibrás), fosfato de potássio anidro (LabSynth), ácido bórico PA ACS (QM Reagentes), borato de sódio decahidratado (LabSynth), ácido L-ascórbico PA ACS (Sigma - Aldrich), cicloexanona PA (Vetec), ácido nítrico PA, 65% (Impex - ASP Labor), nitrato de potássio PA ACS (Reagen - Quimibrás), ferricianeto de potássio PA ACS (Proquimios), cloreto de rutênio PA ACS (Sigma - Aldrich) e solução padrão de cloreto de ouro em HCl (Sigma-Aldrich), tendo sido utilizados sem purificação prévia. As soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade superior a 18 MΩ cm) obtida de sistema de purificação Millipore Direct-Q® 3.

O preparo de soluções padrão 5,0; 1,0; 0,1 e 0,01 mol L⁻¹ de glicerol foi realizado por dissolução do reagente ou diluição de padrões de alta concentração em água deionizada. O hidróxido de sódio e o ácido perclórico foram utilizados no preparo de eletrólito a 0,1 mol L⁻¹, o ácido sulfúrico no preparo de soluções 0,1 e 0,5 mol L⁻¹. Tampões acetato, fosfato e borato 0,1 mol L⁻¹ foram preparados por dissolução dos respectivos sais e adição do ácido, sendo o volume desejado completado com água deionizada. Estas soluções foram preparadas e armazenadas em frascos de polietileno.

O nitrato de potássio foi utilizado no preparo de solução 2,0 mmol L⁻¹, o ferricianeto de potássio em solução 4,0 mmol L⁻¹, o cloreto de rutênio em 4,0 mmol L⁻¹ em ácido nítrico 0,4 mol L⁻¹. Estas soluções foram preparadas a cada dois ou três dias e foram utilizadas em mistura 1:1.

A solução tampão Britton-Robinson foi preparada pela mistura de ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico, todos com concentração de 0,04 mol L⁻¹ no volume total. Hidróxido de sódio sólido (Dinâmica Química Contemporânea Ltda.) foi adicionado lentamente até obter pH próximo de 2,0.

2.2. Instrumentação e materiais

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab μAUTOLAB III, interfaceado a um computador pelo software GPES 4.9.007. Um agitador magnético Metrohm 728 também conectado ao potenciostato e que permite controle através da interface computacional foi utilizado em algumas medidas.

Na montagem dos sistemas eletroquímicos foram utilizados: célula de acrílico de 5,0 mL, célula de vidro de 12,0 mL; fio de platina como eletrodo auxiliar; eletrodo de referência miniaturizado de Ag/AgCl (KCl sat.) montado em laboratório em uma ponteira de micropipeta de 10-100 μL [133]; e eletrodo de trabalho de ouro Metrohm de 3,0 mm de diâmetro interno, eletrodo de platina CH Instruments Inc. de 2,0 mm, eletrodo de carbono vítreo CH Instruments

Inc. de 2,0 mm, eletrodo de diamante dopado com boro montado no laboratório, eletrodos compósitos de adesivo epóxi e pó de grafite modificado com partículas de ouro, construídos no laboratório. Alumina MicroPolish II 0,3 micron Buehler umedecida sobre feltro para polimento dos eletrodos quando necessário.

Na montagem dos eletrodos foram utilizados: ponteiros usadas e limpas de micropipetas de 10, 100 e 1000 μL , fios de platina e cobre, haste de ferro, sobras de tubos de PVC, resina e endurecer epóxi Araldite Brascola, pó de grafite 1-2 μm Aldrich, cola quente, lixas 3M para parede e d'água com variadas faixas de grãos: 300, 600 e 1200.

Nas análises FIA, utilizou-se uma bomba peristáltica Gilson® Minipuls 3. Um injetor manual de acrílico tipo comutador (Cena/USP), tubos de polietileno com diâmetro interno de 1,0 mm para condução das soluções, seringa descartável para inserção da amostra no fluxo, célula de vidro com ET na configuração *wall jet*, isto é, com o fluxo direcionado frontalmente à superfície de detecção do ET, também compunham o sistema.

O preparo de amostras foi realizado pela extração de glicerol do biodiesel em tubos Eppendorf de 1,5 mL ou tubos para centrifuga Ultra Cruz de 15,0 mL (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), utilizando agitador de tubos tipo vortex Phoenix AP 56 e centrífuga Eppendorf 5804 R.

2.3. Eletrodo de ouro

2.3.1. Voltametria cíclica

O eletrodo de ouro foi polido com alumina umedecida sobre uma superfície macia de feltro e enxaguado com água deionizada a cada troca de solução. Os eletrodos de referência e auxiliar também foram enxaguados com água deionizada a cada troca de solução. Os três eletrodos foram imersos em 4,0 mL de eletrólito e conectados ao potenciostato. A escolha do eletrólito foi feita conforme literatura, assim como o procedimento: ciclos de -1,2 a 0,5 V, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , em temperatura ambiente [78]. Foram realizados ciclos do eletrólito e após a adição de glicerol 1,0 mmol L^{-1} .

Após obtenção do perfil eletroquímico do analito, foram avaliados: faixa de potencial, número de ciclos de varredura, potencial de passo (E_{step}) e velocidade de varredura. A faixa de potencial foi alterada em intervalos de 0,1 V restringindo apenas ao sinal desejado. A velocidade de varredura foi aplicada de 10 a 100 mV s^{-1} , em intervalos de 10 mV; o potencial de passo de 1 a 10 mV, com intervalos de 1 mV; e, o número de ciclos aplicados foram: 10, 15, 20 e 30, até a estabilização do sinal. Em todos os casos foram feitas medidas do eletrólito e com uma adição de glicerol 1,0 mmol L^{-1} .

2.3.2. Sistema FIA

O sistema FIA foi montado conforme a Figura 5-A. O eletrólito foi fornecido de forma constante pela bomba peristáltica do sistema propulsor, a seringa foi utilizada para preencher a alça de injeção com a amostra; o injetor comutando entre duas posições, conforme 5-B, permitiu a passagem de eletrólito ou de um volume definido de amostra, seguido de eletrólito. Os eletrodos foram conectados ao potenciostato após o preenchimento da célula.

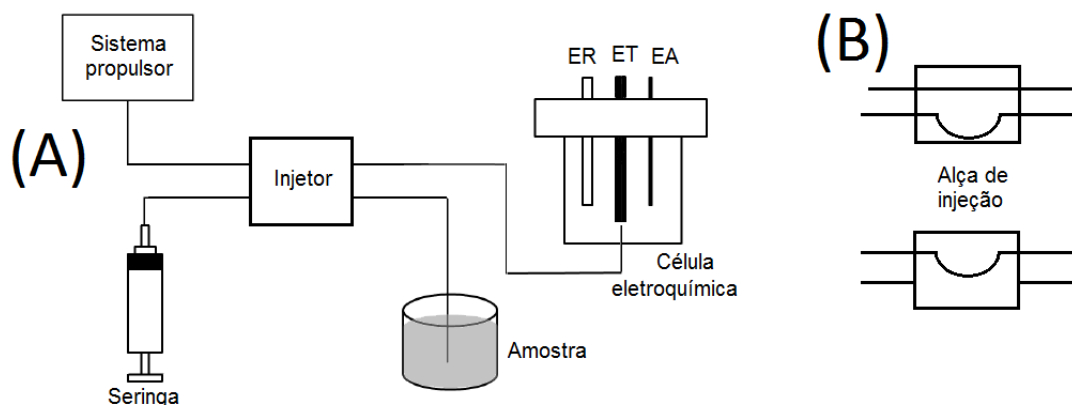


Figura 5. Esquema do sistema FIA utilizado (A) com detalhe do injetor comutador (B).

A obtenção das melhores condições do sistema FIA foi realizada após a escolha dos parâmetros de AMP. Foram avaliados o volume da alça de injeção e a velocidade de injeção, utilizando a bomba peristáltica como controlador de vazão. Inicialmente, fixou-se uma velocidade na bomba peristáltica de 27,5 rpm, correspondente a cerca de $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ com variação de mais ou menos $0,2 \text{ mL}$, e variou-se a alça de injeção, testando volumes de 50, 100, 150, 200 e $300 \text{ }\mu\text{L}$. Em seguida, repetindo o procedimento anterior, mantendo o volume com sinal de corrente mais intenso, foi variada a vazão: 2,0; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e $5,3 \text{ mL min}^{-1}$. As medidas foram feitas por AMP com injeções repetidas de glicerol $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ diluído em eletrólito.

2.3.3. Amperometria

Inicialmente, foi utilizada a técnica AMP para obtenção de um voltamograma hidrodinâmico. Com ET já polido e lavado, a célula de vidro foi preenchida com $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, os eletrodos lavados foram conectados ao potenciostato e a medida foi iniciada, selecionando dez níveis de potencial, de 0 a $0,9 \text{ V}$, intervalos de $0,1 \text{ V}$. Após estabilização da linha base, foi feita uma adição de glicerol $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Os maiores sinais de corrente foram anotados, selecionando os respectivos potenciais para um novo voltamograma hidrodinâmico, este com intervalos de $0,05 \text{ V}$ entre os níveis de potencial, obtendo-se o potencial de análise correspondente ao maior sinal de corrente. Este procedimento foi realizado empregando célula de vidro preenchida com $10,0 \text{ mL}$ de eletrólito sob agitação magnética constante e também em sistema FIA.

Após obtenção do potencial de análise, a técnica de amperometria a potencial constante foi selecionada, o sistema FIA foi preenchido com eletrólito e foram feitas injeções de glicerol $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

A mesma concentração de glicerol $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ foi injetada para testes com AMP utilizando dois e três pulsos. Em AMP com dois potenciais foi utilizado um abaixo do de análise, escolhido entre 0, - $0,1$ e - $0,2 \text{ V}$, sendo o tempo de aplicação de cada potencial de 500 ms. Com três pulsos, foram utilizados os dois escolhidos anteriormente e um terceiro acima do potencial de análise, sendo testados: 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e $1,0 \text{ V}$, também com tempo de pulso de 500 ms. Definidos quantos e quais os potenciais de maior sensibilidade, foi testado o tempo de aplicação dos potenciais, variando de 0,1 a $1,0 \text{ s}$, com intervalos de 100 ms.

2.3.4. Preparo de amostras de biodiesel

A extração de glicerol do biodiesel foi realizada a temperatura ambiente conforme sistemas apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Sistemas de extração de glicerol de biodiesel

Sistema	Água	Biodiesel	Solvente	Agitação	Separação
1	500,0 µL	500,0 µL	-	5 min	Repouso ou centrifuga por 5 min a 3000 rpm
2	667,0 µL	333,0 µL	-	5 min	Repouso ou centrifuga por 5 min a 3000 rpm
3	750,0 µL	250 µL	-	5 min	Repouso ou centrifuga por 5 min a 3000 rpm
4	4,0 mL	1,0 g	-	5 min	Centrifuga por 5 min a 3000 rpm [43]
5	650,0 µL	188,0 µL	162,0 µL de clorofórmio	10 min	Centrifuga por 15 min a 2000 rpm [50]
6	436,0 µL com 50% (v/v) de etanol 95%	127,0 µL	437,0 µL de hexano	5 min	Centrifuga por 5 min a 2000 rpm [44]

Cada sistema foi preparado em triplicata, puro e com diferentes níveis de fortificação, como apresentado na Tabela 9. Os diferentes níveis foram obtidos pela adição de diferentes volumes de padrão de glicerol $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Foram testadas concentrações de fortificação em níveis abaixo e acima do limite de $2,17 \text{ mmol L}^{-1}$ para verificar alterações na extração, comparando os sistemas 3-A e 3-B, e na detecção, comparando os sistemas 4 e 6, por exemplo.

Tabela 9. Níveis de fortificação nos diferentes sistemas de extração.

Sistema	Concentração final de glicerol adicionada na fortificação [mmol L^{-1}]		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3
1	1,67	2,31	2,86
2	1,30	1,84	2,31
3-A	1,17	1,67	2,10
3-B	1,33	2,65	3,96
4	0,39	0,70	-
5	1,33	1,87	2,35
6	1,86	2,56	3,14

Após reunir os componentes de cada sistema nos tubos ou de 1,5 mL ou de 15,0 mL, os tubos foram vedados e agitados em vortex e foi feita a separação, ou com repouso ou com centrifuga. Após separação de fases, alíquotas de 15,0 µL da fase aquosa dos sistemas 1, 2, 3, 5 e 6 ou alíquotas de 50,0 µL da fase aquosa do sistema 4, foram diluídas em 5,0 mL de eletrólito e injetadas em triplicata no sistema AMP-FIA. Todos os sistemas de extração foram testados em apenas uma das amostras. O sistema de melhor resultado, escolhido em função da faixa de recuperação, foi adotado nas análises posteriores.

2.3.5. Parâmetros de mérito

Para comparar os resultados obtidos pelas técnicas eletroquímicas com resultados já apresentados na literatura e métodos padronizados, parâmetros de mérito foram determinados. De acordo com o INMETRO [78], os parâmetros de validação variam conforme o tipo de ensaio, sendo que, para análise de elementos menores e traços, isto é, aqueles com concentração entre 0,01 a 1,0% e abaixo de 0,01%, respectivamente, devem ser calculados: precisão (coeficiente de variação com base no desvio padrão, repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade), seletividade, exatidão (tendência ou recuperação), robustez, sensibilidade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação. Como o glicerol no biodiesel se encaixa como elemento menor, alguns dos parâmetros acima citados foram determinados, como segue.

2.3.5.1. Precisão

2.3.5.1.1. Repetitividade

A repetitividade foi determinada por AMP-FIA. O sistema de fluxo foi preenchido com o eletrólito, a técnica foi selecionada nas condições ótimas, e foram feitas quatorze injeções consecutivas de padrão de glicerol 1108 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Foram calculados o desvio padrão absoluto (S), dado pela Equação 1, e o desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), conforme Equação 2, sendo \bar{X} a média de corrente das injeções, X_i o sinal de corrente de uma injeção, e N o total de injeções.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N-1}} \quad \text{Equação 1}$$

$$RSD = CV = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

2.3.5.1.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária é verificada com a variação de dias, analistas, equipamentos ou combinação destes, na realização das medidas [43].

Foram obtidas curvas analíticas em dias diferentes. Cinco concentrações de padrões de glicerol foram diluídos no eletrólito, o sistema FIA foi preenchido, os eletrodos conectados ao potenciostato e procedeu-se à medida por AMP, sendo cada concentração injetada em triplicata. Comparando os valores de sinal de corrente para a mesma concentração em diferentes dias, obteve-se a precisão intermediária. Os valores de coeficiente angular da reta, o coeficiente de correlação do ajuste linear e o desvio padrão também foram comparados.

2.3.5.1.3. Reprodutibilidade

Também conhecida como precisão inter-laboratorial, compara resultados obtidos por dois ou mais laboratórios. É importante quando um laboratório busca a verificação de

desempenho do método desenvolvido, sendo realizada, geralmente, através de estudos colaborativos aplicados à padronização de metodologias analíticas [134, 135].

A reprodutibilidade não foi estudada para o método aqui apresentado.

2.3.5.2. Seletividade

A seletividade é dada pela resposta do método ao analito independente de interferentes, compostas que podem alterar o sinal do analito com magnitude proporcional à concentração. Ensaios com padrões de glicerol e interferentes, amostras com e sem o analito, são necessários para determinar a seletividade do método. Quando não é possível determinar quais são os interferentes, é necessário testar a matriz em diferentes métodos, técnicas ou por variações das condições experimentais [136, 137]. Tais testes não foram realizados.

2.3.5.3. Exatidão

A exatidão foi determinada em termos de recuperação, com adições de padrões de glicerol em diferentes níveis de concentração à alíquotas de biodiesel em triplicata, conforme procedimento do item 2.3.4. A Equação 3 foi utilizada para determinar a porcentagem de glicerol extraído do biodiesel, sendo $C_{\text{observada}}$ o valor experimental obtido e C_{esperada} , a concentração adicionada inicialmente.

$$\text{Recuperação} = \frac{C_{\text{observada}}}{C_{\text{esperada}}} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

2.3.5.4. Sensibilidade

É o parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da reta de regressão da curva analítica, parâmetro B, conforme a Equação 4. Foi determinada simultaneamente com os testes de linearidade.

$$B = \frac{\text{variação da resposta}}{\text{variação da concentração}} \quad \text{Equação 4}$$

2.3.5.5. Linearidade

Padrões de glicerol foram diluídos no eletrólito em diferentes concentrações: 100, 244, 388, 532, 676, 820, 964, 1108, 1252, 1396, 1540 e 1684 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A faixa de concentração contém a máxima concentração esperada de glicerol em biodiesel como ponto central. O sistema FIA foi preenchido, ET, ER e EA foram conectados ao sistema de detecção e foram realizadas injeções em triplicata de cada concentração, relacionando a corrente média à concentração injetada, obtendo-se a curva analítica.

2.3.5.6. Faixa de trabalho

A faixa de trabalho é determinada a partir da linearidade, sendo o limite mínimo o LQ e o limite máximo o do detector [136, 137]. Assim, o sistema AMP-FIA foi devidamente montado e preenchido, padrões de glicerol foram preparados nas concentrações utilizadas na determinação da linearidade acrescentados de um ponto inferior e quatro superiores: 1, 100, 244, 388, 532, 676, 820, 964, 1108, 1252, 1396, 1540, 1684, 1828, 2000, 2144 e 2288 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Cada padrão foi injetado em triplicata e os valores médios de corrente foram relacionados às concentrações.

2.3.5.7. Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado utilizando o sinal da linha base da curva analítica. Foi determinada a altura do ruído da linha base e, utilizando a Equação 5, foi obtido o mínimo do sinal de corrente que corresponde à menor concentração de glicerol que pode ser detectada pelo método, sendo S o desvio padrão de 3 curvas de calibração contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação, B é a inclinação da curva de calibração.

$$LD = \frac{3.S}{B} \quad \text{Equação 5}$$

2.3.5.8. Limite de quantificação

O limite de quantificação foi determinado de forma semelhante ao de detecção. Tomando como sinal de referência o ruído da linha base das medidas amperométricas para obtenção de uma curva analítica, o valor do desvio padrão S foi aplicado na Equação 6, obtendo-se o sinal da menor concentração de glicerol que pode ser quantificada com exatidão e confiabilidade.

$$LQ = \frac{10.S}{B} \quad \text{Equação 6}$$

2.3.5.9. Robustez

A robustez do método, capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos, foi verificada ao longo das análises: durante as medidas de avaliação das melhores condições, em que se variaram os parâmetros eletroquímicos; durante a obtenção das curvas analíticas, em que foram variados limites máximo e mínimo de concentração de glicerol, quantidade de pontos no sinal analítico obtido a cada medida; durante a extração de glicerol do biodiesel.

A robustez foi avaliada a partir das análises anteriores: curvas analíticas e amostras em diferentes dias, recuperação, LD e LQ.

2.4. Eletrodo de platina

Foram utilizadas as condições apresentadas por Lourenço e Stradiotto [5]: ET de platina, ER de Ag/AgCl, solução de ácido perclórico (HClO_4) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito, e medidas por voltametria cíclica de -0,14 a 1,3V com velocidade de 100 mV s^{-1} ; eletrodo auxiliar de fio de platina completou o circuito elétrico. Adições de padrão de glicerol foram feitas na faixa de 19,5 a $163,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

2.5. Eletrodo de carbono vítreo

Na montagem da célula eletroquímica para detecção de glicerol, foram testados os eletrólitos: ácido perclórico (HClO_4) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido sulfúrico (H_2SO_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, soluções de baixo pH pois este influencia no perfil do filme obtido, no processo de transferência de elétrons [93]. Utilizando a técnica de voltametria cíclica foram realizadas varreduras de potencial de -0,4 a 1,3 V, velocidade de varredura de $0,05 \text{ V s}^{-1}$ e potencial de passo de 0,008 V.

2.5.1. Formação do filme de hexacianoferrato de óxido de rutênio

Para formação do filme de RuOHCF, o eletrodo de carbono vítreo foi polido em alumina, lavado com água deionizada, e conectado à célula eletroquímica juntamente com ER de Ag/AgCl e EA de platina. A célula foi preenchida com uma solução contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de nitrato de potássio (KNO_3), $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio [$\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6$] e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de cloreto de rutênio (RuCl_3) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido nítrico (HNO_3). Voltamogramas cíclicos foram realizados de -0,4 a 1,3 V, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} durante 60 ciclos. Após a formação do filme, o eletrodo e a célula foram lavados com água deionizada, a célula foi preenchida com o eletrólito e mais 60 ciclos voltamétricos foram realizados.

2.5.2. Determinação eletroquímica de glicerol

Após formação e estabilização do filme de RuOHCF em eletrodo de carbono vítreo no eletrólito de melhor resposta, adições de glicerol de 5,0 a $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foram analisadas por voltametria cíclica, registrando os três primeiros ciclos de cada concentração.

2.6. Eletrodo de diamante dopado com boro

2.6.1. Construção e ativação do eletrodo

Uma placa condutora de silício revestida de filme de diamante dopado com boro (DDB), fornecida por Adamant Technologies (Suíça) com 0,7 cm de lado e dopagem a 8000 ppm, foi utilizada na construção do eletrodo. A placa foi fixada a uma haste cilíndrica de aço utilizando cola condutora de prata. Após secagem, a lateral da peça e da haste foram isoladas utilizando PVC dissolvido em THF; com a secagem do THF, o PVC adere à superfície conferindo resistência mecânica e isolamento elétrico. O contato ao potenciostato foi feito através de um pino condutor na extremidade oposta ao filme de DDB.

Após secagem completa (24h), foi feita a ativação do eletrodo de DDB. Selecionando a técnica de voltametria cíclica, o eletrodo foi conectado junto ao de referência e auxiliar, em meio de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e deu-se início à varredura. Após 50 ciclos, a corrente estabiliza e uma faixa maior de potencial é selecionada para nova varredura. O processo é repetido até os limites de liberação de oxigênio e hidrogênio.

2.6.2. Determinação eletroquímica de glicerol

O eletrodo de diamante exige ativação antes e após o uso em sistemas específicos; a ativação anódica utiliza solução Britton-Robinson e a catódica, H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; a técnica utilizada é a cronoamperometria potenciométrica com intervalo de 0,2 s, corrente anódica de 0,01 A e catódica de -0,01 A, com duração total de 1000 s.

Após a ativação, foram feitos testes de diferentes eletrólitos em diferentes janelas de potencial por voltametria cíclica: H_2SO_4 , HClO_4 , tampões acetato, fosfato e borato e NaOH, todos com concentração igual a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; foram estudadas janelas de potencial de -1,0 a 1,0; a 1,5; a 2,0 e de -1,0 a 2,5 V, mantendo a velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Os dois melhores sinais de cada janela de potencial foram selecionados para os testes com adição de padrão de glicerol. Estando a célula eletroquímica montada e preenchida com o eletrólito de menor corrente de fundo, adicionou-se $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicerol e foram realizados voltamogramas cíclicos. Após definir a janela de potencial de trabalho, variou-se a velocidade de varredura e o potencial de passo até obter o melhor sinal.

2.7. Eletrodos compósitos

2.7.1. Modificação de grafite com partículas de ouro

O grafite foi modificado no laboratório, conforme procedimento de Dai *et al.* [105], sendo utilizada uma solução de padrão cromatográfico como reagente fonte de ouro. Solução padrão de ouro ($50,0 \text{ }\mu\text{L}$) e $45,0 \text{ mg}$ de L-ácido ascórbico foram dissolvidos em $50,0 \text{ mL}$ de água, o pH foi ajustado até 6,4 com adição de solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, $50,0 \text{ mg}$ de grafite em pó foram adicionados sob agitação magnética constante, permanecendo por 24h. Ao fim da agitação, o grafite foi filtrado, lavado com água e seco ao ar.

2.7.2. Preparo do compósito

A um frasco de vidro de $8,5 \text{ mL}$ foram adicionados: $1,5 \text{ mL}$ de cicloexanona, $0,05 \text{ g}$ de resina epóxi, $0,05 \text{ g}$ de endurecedor epóxi, agitando magneticamente até homogeneização após cada adição. Sob agitação leve e constante, foi adicionado $1,0 \text{ g}$ de pó de grafite modificado com partículas de ouro. Em seguida, o frasco foi tampado, vedado e permaneceu sob agitação magnética por 24h.

2.7.3. Construção dos eletrodos

Um fio de cobre de 2,0 mm de diâmetro foi usado como contato elétrico: foram cortados pedaços de cerca de 5,0 cm de comprimento, descascados e lixados nas laterais e pontas. Foram aproveitadas ponteiros de micropipetas de 10-100 μL para montagem dos eletrodos de trabalho. Após lavagem e secagem, as pontas foram cortadas a cerca de 4,0 mm da extremidade mais fina. No interior de cada ponteira foi encaixado o fio de cobre, fixando com uma fina camada de adesivo epóxi na superfície interna da extremidade mais fina e cola quente na mais grossa. Após fixação, o compósito foi adicionado na extremidade mais fina, preenchendo todo o espaço disponível. O eletrodo foi posto para secagem em condições ambientes por 24h. Em seguida, os eletrodos foram lixados em lixas 300, 600 e 1200 para homogeneizar a superfície, retirando as imperfeições decorrentes do processo de montagem.

2.7.4. Testes eletroquímicos

O eletrodo compósito de grafite modificado com partículas de ouro foi utilizado de modo comparativo ao eletrodo comercial de ouro, em meio de NaOH 0,1 mol L^{-1} , sendo testados também como eletrólitos soluções de H_2SO_4 e HClO_4 0,1 mol L^{-1} .

Foi utilizada a técnica de voltametria cíclica em diferentes faixas de potencial, como mostra a Tabela 10, mantendo a velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Foram feitas adições de glicerol 50 mmol L^{-1} em cada condição.

Tabela 10. Faixas de potencial aplicadas por voltametria cíclica para determinação de glicerol utilizando eletrodos compósitos de grafite modificado com partículas de ouro.

Potencial inicial [V]	0	-0,4	-0,4	-0,4
Potencial final [V]	0,8	0,8	1,0	1,3

Para todos os testes, os eletrodos compósitos foram inicialmente limpos em lixa d'água, lavados com água deionizada e conectados ao sistema juntamente com o ER de Ag/AgCl e o EA de platina. O eletrólito foi adicionado à célula e as medidas foram realizadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Eletrodo de ouro

3.1.1. Voltametria cíclica

A voltametria de glicerol em meio alcalino em eletrodo de ouro é bem documentada na literatura. O perfil eletroquímico obtido para o glicerol é conforme o apresentado na literatura, sendo o eletrólito NaOH 0,1 mol L⁻¹ [78]. A Figura 6 apresenta o primeiro e o décimo quinto ciclo de varredura do eletrólito na ausência e na presença de glicerol. As setas indicam o sentido de varredura.

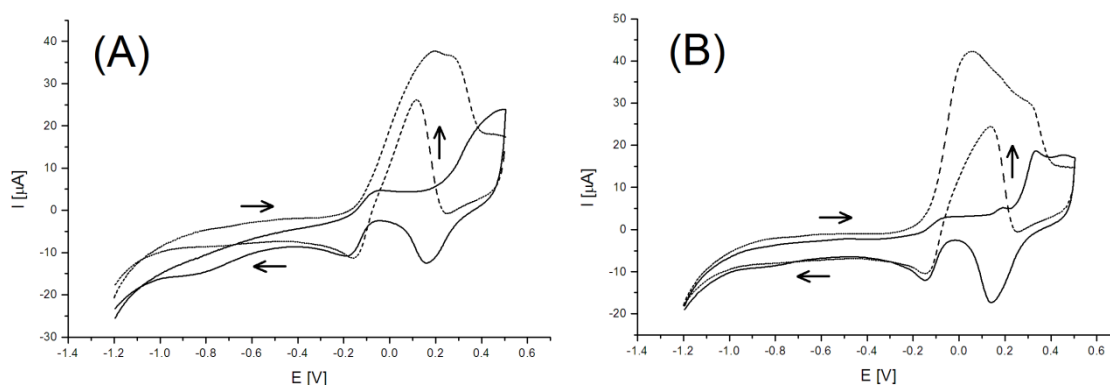


Figura 6. Voltamogramas cíclicos em meio de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (—) e após a adição de glicerol 1,0 mmol L⁻¹ (---), no primeiro ciclo (A) e após o décimo quinto ciclo (B). Varredura de -1,2 a 0,5 V, velocidade de 50 mV s⁻¹, E_{step} de 5 mV.

Observa-se que na região de -1,2 a -0,3 V não há sinal de oxidação ou redução de glicerol. Acima de 0,5 V verifica-se um aumento significativo na escala de corrente, sendo este potencial definido como limite máximo da voltametria; o limite mínimo foi definido no potencial de -0,8 V. O potencial de passo utilizado foi de 5 mV e a velocidade de varredura, de 50 mV s⁻¹. Comparando os sinais do eletrólito e após a adição de glicerol 1,0 mmol L⁻¹ no primeiro e no 15º ciclo, observa-se que o 15º ciclo do eletrólito está com a corrente de fundo estabilizada, o 15º ciclo do glicerol apresenta dois picos de oxidação, em 0 V e em 0,3 V, correspondentes à oxidação do eletrólito e do eletrodo, sinais que não estão presentes no primeiro ciclo. O 15º ciclo foi utilizado em todas as análises posteriores.

A Figura 7 apresenta os voltamogramas obtidos com adições sucessivas de glicerol, de 0,5 a 6,5 mmol L⁻¹. A seta horizontal indica o sentido de varredura e a vertical indica o aumento de concentração. Os voltamogramas indicam que a oxidação eletrocatalítica de glicerol inicia por volta de -0,15 V e dois picos de oxidação são observados entre -0,15 e 0,4 V, sendo obtida boa separação em altas concentrações. O segundo pico, em 0,2 V, aumenta significativamente com adições sucessivas de glicerol, porém de forma não linear a partir de 4,0 mol L⁻¹. Esses resultados estão de acordo com a literatura [78, 79, 82].

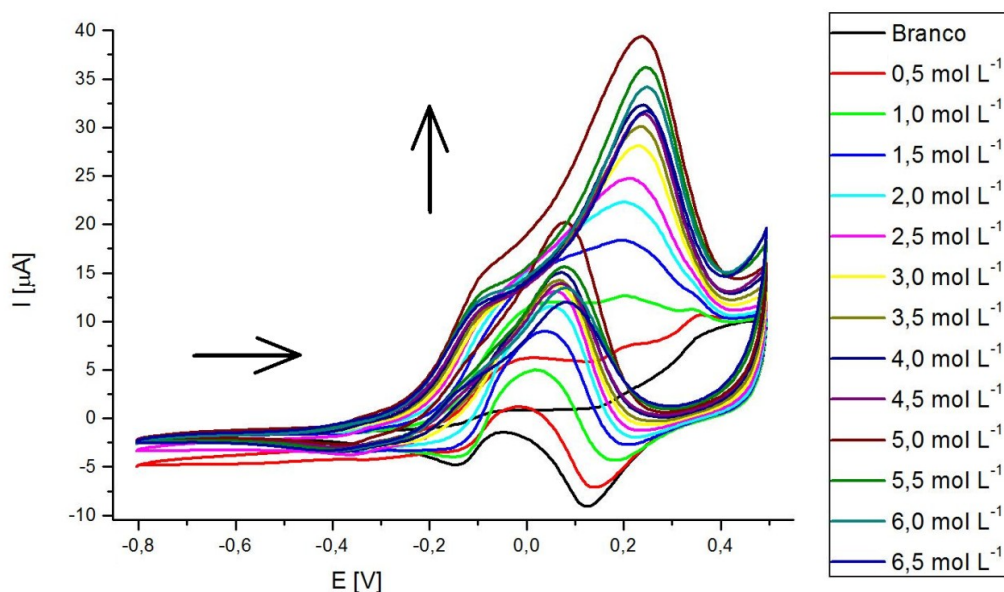
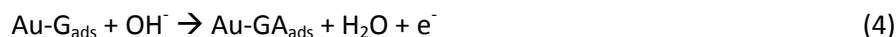


Figura 7. Voltamograma cíclico em meio de NaOH 0,1 mol L⁻¹ com concentrações crescentes de glicerol, de 0,5 a 6,5 mmol L⁻¹. Varredura de -0,8 a 0,5 V, velocidade de 50 mV s⁻¹.

O mecanismo proposto para a eletro-oxidação do glicerol em eletrodo de ouro em meio básico envolve a formação inicial de AuOH [82] – reação (1) do mecanismo – seguida da desprotonação catalisada por íons hidroxila em solução – reação (4) do mecanismo. O produto principal desta oxidação primária é o gliceraldeído, que é oxidado à ácido glicérico e ácido tartárico à potenciais maiores que 0,7 V [78, 79, 82], produtos não obtidos já que a faixa de varredura do voltamograma foi de -0,8 a 0,5 V. No sentido negativo de varredura tem-se a oxidação do gliceraldeído e a limpeza da superfície do eletrodo.

Assim, podemos esquematizar o mecanismo abaixo para as condições voltamétricas utilizadas, sendo G, glicerol, e GA, gliceraldeído. As reações de 1 a 4 ocorrem no sentido positivo do ciclo, e 5, na direção negativa.



3.1.2. Amperometria

Os voltamogramas hidrodinâmicos, obtidos com agitação magnética constante e em sistema FIA, são apresentados na Figura 8.

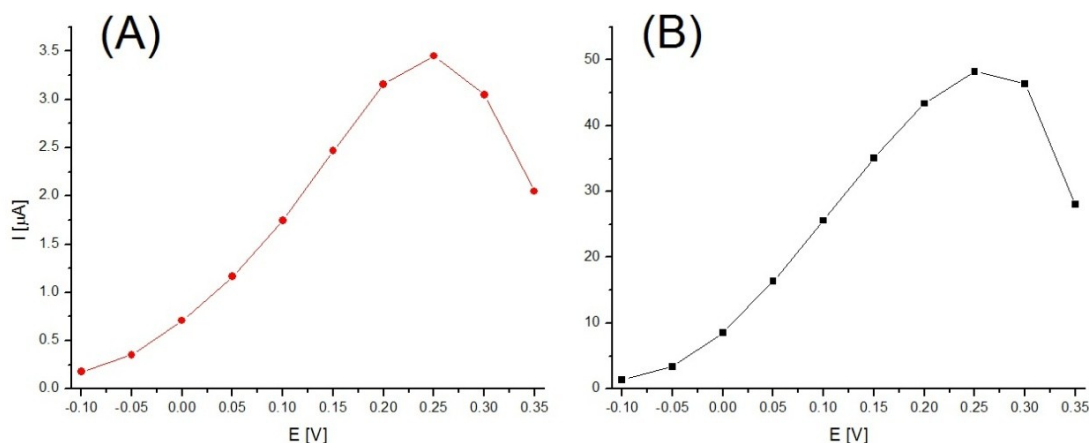


Figura 8. Voltamograma hidrodinâmico de eletrodo de ouro em meio de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, injeção de glicerol $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, em sistema em batelada sob agitação magnética constante (A) e em sistema FIA (B).

Em ambos, foi obtido um máximo em potencial igual a $0,25 \text{ V}$. Observa-se que a intensidade de corrente é bem maior em sistema em fluxo que com agitação magnética. O sistema FIA foi utilizado em todas as medidas posteriores.

Na técnica de amperometria a potencial constante, potencial de $0,25 \text{ V}$, injeções de glicerol $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ resultaram em longo tempo de estabilização da linha base (até 10 minutos) e baixa repetitividade em injeções sucessivas, apesar da baixa corrente de fundo. Este comportamento pode estar relacionado ao mecanismo de oxidação do glicerol que requer uma superfície modificada com hidróxidos para catalisar a desprotonação [78, 82], conforme mecanismo apresentado no item 3.1.1. Além disso, a oxidação eletroquímica de glicerol causa a passivação do eletrodo, devido à adsorção de produtos, conforme a Figura 9, que mostra a superfície do eletrodo de ouro lixada, brilhante e totalmente livre para a transferência de elétrons (9-A), e ao final de uma análise (9-B).

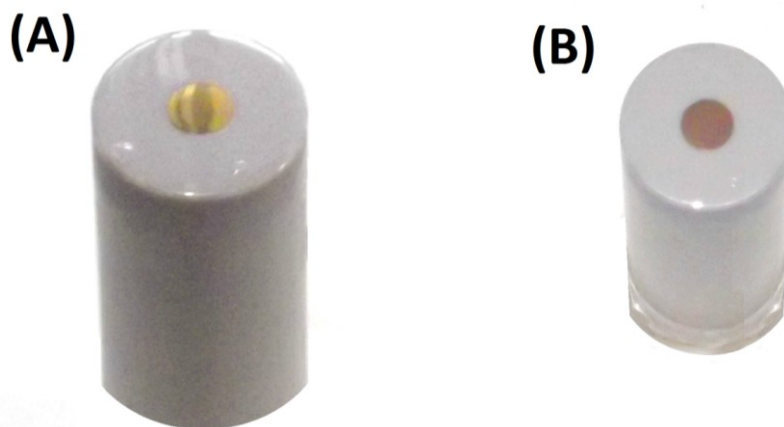


Figura 9. Superfície metálica do eletrodo de ouro, antes (A) e depois de análise (B).

A modificação eletrocatalítica da superfície do eletrodo, a detecção de glicerol e a limpeza do eletrodo, isto é, a diminuição da passivação por adsorção de produtos, podem ser obtidas de forma simultânea na análise utilizando amperometria de múltiplos pulsos, também chamada amperometria pulsada [78, 82].

Na amperometria pulsada com três potências foi obtido um sinal repetitivo para injeções sucessivas de glicerol $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, com rápida estabilização da linha base. Além disso, a intensidade de corrente do analito aumentou cerca de 70 vezes comparado ao sinal obtido a potencial constante. Assim a técnica AMP foi utilizada em todas as medidas posteriores, garantindo um método rápido, de alta frequência analítica e de boa sensibilidade, sendo aplicada a sequência de potenciais de $-0,2$; $0,25$ e $0,7 \text{ V}$, cada um aplicado por $0,1 \text{ s}$. A escolha dos potenciais está relacionada ao mecanismo de oxidação eletrocatalítica de glicerol (voltamogramas da Figura 7). Em $0,25 \text{ V}$ ocorre a detecção de glicerol com maior intensidade, evidenciado na Figura 8, em $0,7 \text{ V}$ ocorre a formação de óxidos de ouro inativos e a remoção dos produtos de oxidação orgânicos adsorvidos, e em $-0,2 \text{ V}$ ocorre a redução dos óxidos de ouro e a consequente renovação da superfície de ouro do eletrodo. A Figura 10 mostra o sinal de corrente obtido nos três potenciais.

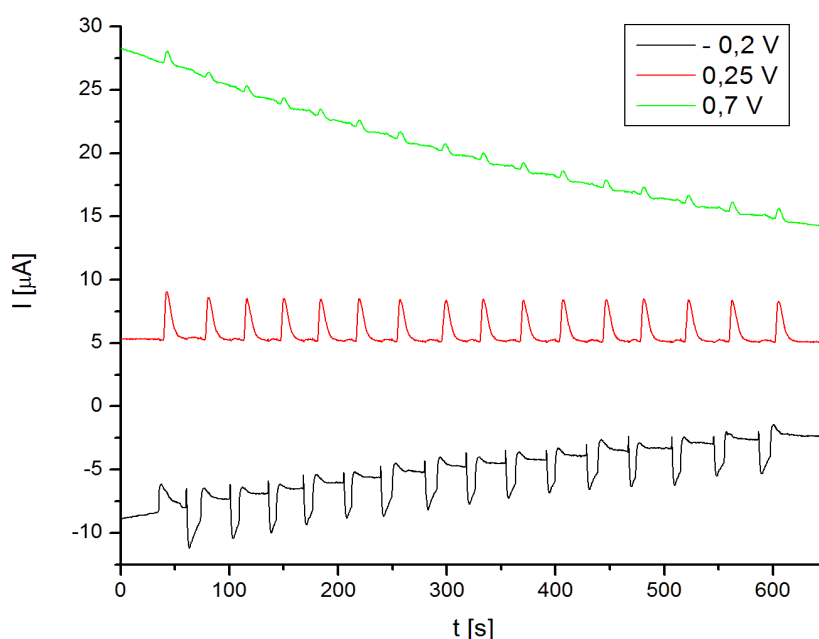


Figura 10. Amperograma FIA em meio de $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com injeções repetitivas de glicerol padrão $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em três níveis de potencial: $-0,2$; $0,25$; $0,7 \text{ V}$.

No potencial de $-0,2 \text{ V}$ ocorrem picos num padrão constante, devido à movimentação do injetor alternando entre as posições de passagem de eletrólito e injeção de amostra, o que indica alta sensibilidade do eletrodo de ouro. No potencial de análise, $0,25 \text{ V}$, obtém-se sinal repetitivo do padrão de glicerol $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, injetado durante 10 minutos. No potencial de $0,7 \text{ V}$ obtém-se sinal dos produtos de oxidação do glicerol com intensidade de corrente cinco vezes menor que no potencial de análise, sinal que foi desprezado nas análises posteriores. Dentre os três potenciais utilizados, apenas o de análise, $0,25 \text{ V}$, apresenta linha base de corrente constante e uniforme, com rápida estabilização; os outros dois potenciais utilizados variam o sinal de corrente da linha base durante toda a análise, o que pode indicar a formação e redução de óxidos de ouro de forma constante na superfície do eletrodo.

3.1.3. Sistema FIA

Na avaliação dos parâmetros do sistema em fluxo, o sinal máximo foi obtido com volume de injeção de 200 μL , como mostra a Figura 11A, porém, a melhor repetitividade foi obtida com 150 μL e sendo a diferença entre as alturas médias dos picos de 10,4%, o volume de 150 μL foi escolhido como ótimo. Na Figura 11B tem-se o sinal máximo de corrente para velocidade de injeção de $4,0 \pm 0,2 \text{ mL min}^{-1}$ de vazão.

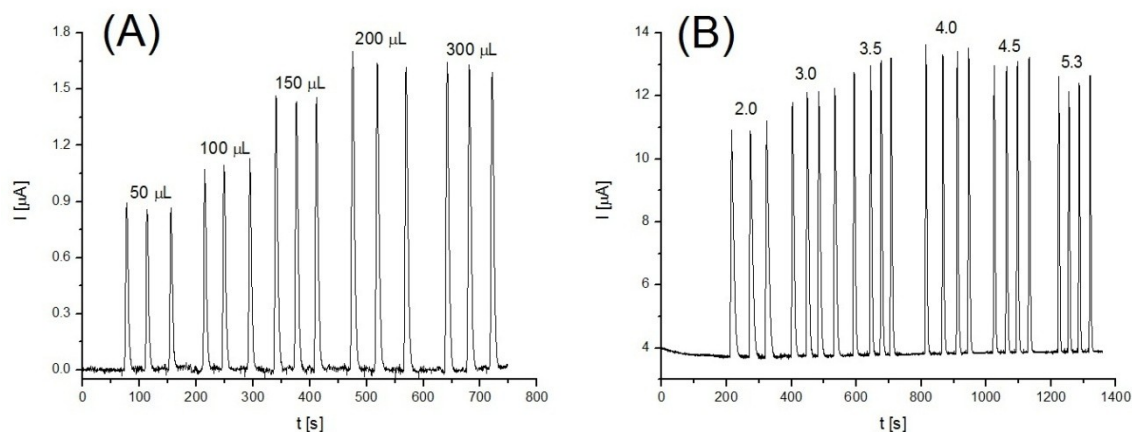


Figura 11. Amperogramas com variação de parâmetros do sistema FIA: volumes de injeção (A) dados em μL , e velocidade de injeção (B) dada em mL min^{-1} .

3.1.4. Preparo de amostras de biodiesel

Após preparo, extração, análise eletroquímica e obtenção da faixa de recuperação de cada sistema de extração testado, os valores médios obtidos para recuperação foram comparados, como mostra a Figura 12.

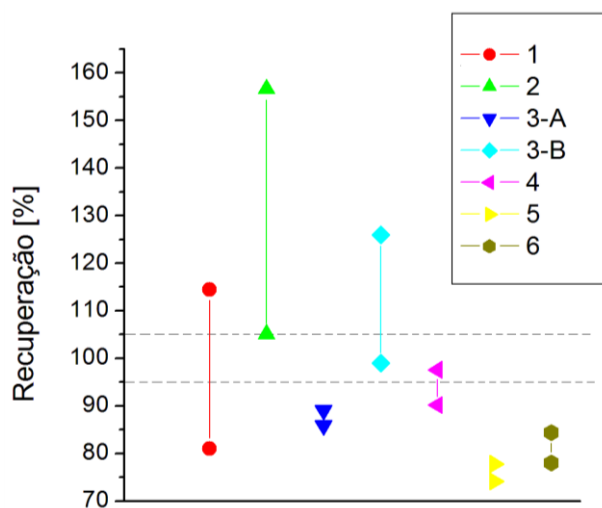


Figura 12. Faixas de recuperação nos diferentes sistemas de extração.

Os valores de recuperação estipulados em norma para componentes traços, caso do glicerol em biodiesel, variam de 95 a 105% conforme Inmetro [135, 136], linhas horizontais tracejadas na Figura 12. No sistema 1 foi obtida uma faixa de recuperação de 81,0 a 114,4%, intervalo de mais de 33%, enquanto que na norma tem-se uma diferença de apenas 10%. O

sistema 2 apresentou valores de recuperação de 105,1 a 156,6%, com um mínimo muito acima do indicado, e um intervalo de mais de 50%. No sistema 3-A, a faixa de recuperação obtida foi de 85,9 a 89,1%, abaixo da estipulada. No sistema 3-B foram utilizadas concentrações maiores de glicerol para fortificação das amostras sendo mantido o procedimento, e observou-se uma melhora significativa na recuperação, obtida a faixa de 99,0 a 125,9%, com o limite inferior dentro da faixa estipulada e o superior cerca de 20% maior. O sistema 4 pode ser considerado o melhor dentre os estudados pois apresenta valores próximos do indicado e uma faixa estreita, de 90,2 a 97,6%. No sistema 5 foi obtida uma faixa de 74,1 a 77,8% e no sistema 6, de 78,0 a 84,4%, valores abaixo do estipulado, o que indicam a baixa eficiência dos sistemas orgânicos testados.

O sistema 4 foi o escolhido para os testes seguintes por apresentar a melhor faixa de recuperação, próxima aos valores estipulados e com um pequeno intervalo entre seus limites; por requerer os menores tempos de agitação e centrifugação (cinco minutos cada) e por utilizar apenas água como solvente de extração.

3.1.5. Parâmetros de mérito

3.1.5.1. Precisão

3.1.5.1.1. Repetitividade

A Figura 13 apresenta o amperograma das injeções repetidas de glicerol 0,1 mmol L⁻¹. Utilizando as equações 1 e 2 previamente apresentadas, foi obtido o desvio padrão absoluto S de 0,134 μA e o desvio padrão relativo RSD de 4,76%; menores que o máximo estipulado para análises de componentes menores de 25% [135, 136]. Portanto, o método é repetitivo.

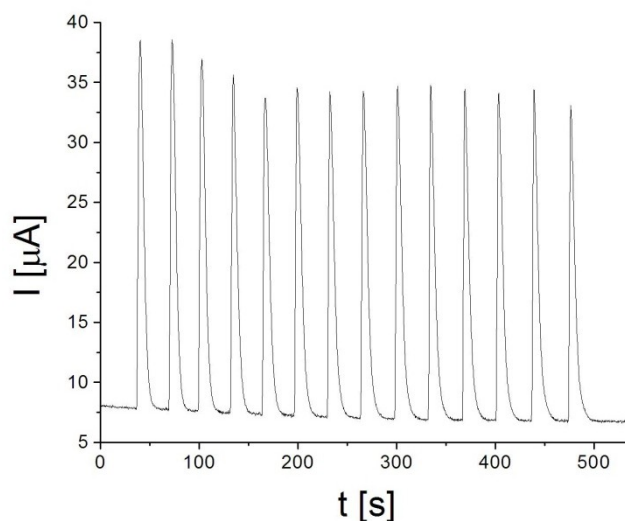


Figura 13. Amperograma de eletrodo de ouro em meio de NaOH 0,1 mol L⁻¹ com injeções repetitivas de glicerol padrão 1108 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições: 150 μL de volume de injeção, 4,0 mL min⁻¹ de vazão, potenciais de -0,2; 0,25 e 0,7 V.

3.1.5.1.2. Precisão intermediária

Com as curvas analíticas obtidas em diferentes dias, foi escolhido o valor de concentração de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ para comparação do sinal de corrente, como apresentado na Tabela 11 a seguir. Com o ajuste linear das curvas analíticas pode-se calcular o valor de corrente nesta concentração (I') e determinar a diferença entre o valor experimental e o teórico ($|I-I'|$). Também são apresentados os dados de ajuste linear das curvas analíticas: coeficiente de correlação R, desvio padrão S e coeficiente angular B.

Tabela 11. Valores de correntes para concentração de $150,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Análise	$I [\mu\text{A}]$	$I' [\mu\text{A}]$	$ I-I' [\mu\text{A}]$	R	$SD \times 10^7$	B
1	17,971	17,678	0,293	0,99977	2,26333	0,11768
2	11,680	11,770	0,090	0,99961	1,92992	0,07713
3	13,563	12,594	0,969	0,99516	7,24479	0,08236
4	17,263	16,919	0,344	0,99849	5,32914	0,10877
5	28,937	27,308	1,629	0,99047	17,881	0,18552
6	18,279	18,234	0,045	0,99991	1,4449	0,12175

Nas primeiras colunas têm-se os valores de corrente experimental, teórico, isto é, calculado pela equação de ajuste linear, e a diferença entre os dois valores. Observa-se que para os seis valores apresentados, apenas um apresenta uma diferença maior que uma unidade, de $1,629 \mu\text{A}$.

As correntes com menor diferença entre experimental e teórico ($0,045$ e $0,090$) foram obtidas nas curvas com maiores coeficientes de correlação no ajuste linear, com três nove após a casa decimal ($0,99991$ e $0,99961$), e com menores desvios ($1,4449 \times 10^{-7}$ e $1,92992 \times 10^{-7}$).

Os dados da Tabela 11 são valores médios de quatro repetições de injeção da mesma concentração de glicerol. Os valores da quarta coluna podem ser apresentados como um gráfico de resíduos, como mostra a Figura 14, sendo o resíduo a diferença entre o valor experimental e o teórico de cada uma das quatro injeções do padrão.

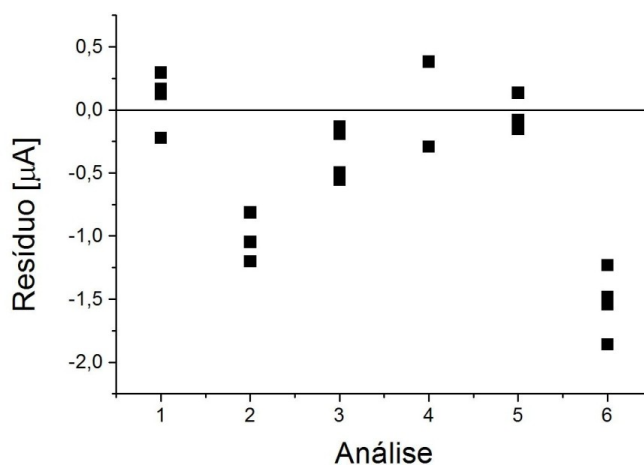


Figura 14. Resíduo de corrente para amostras de padrão de glicerol $150,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A precisão, proximidade entre várias medidas, pode ser observada principalmente nas análises 1, 2, 3 e 5. As análises 4 e 6 apresentam pontos mais distanciados, mas com pequeno

intervalo entre os mesmos. Várias análises apresentam pontos completamente sobrepostos, como em 4 em que se observa apenas dois pontos. A exatidão, boa concordância entre os valores experimentais e teóricos, pode ser observada nos pontos próximos à linha de zero na ordenada (análises 1, 3, 4 e 5), estando os pontos mais distantes a cerca de $1,6 \mu\text{A}$. Na análise 6 não foi obtida boa exatidão, mas a precisão é aceitável, já que para o valor a ser descartado teria de ser maior que quatro vezes o desvio padrão do ajuste linear, igual a $7,15 \mu\text{A}$ nesta análise.

Como a cada dia de análise têm-se os resíduos concentrados numa faixa diferente de corrente, é necessário determinar a curva analítica para cada análise de amostra.

3.1.5.2. Exatidão

A Figura 15 apresenta um amperograma para a determinação de glicerol nas duas amostras de biodiesel trabalhadas, sem fortificação e após a fortificação com duas concentrações distintas de glicerol para extração conforme sistema 4. No início tem-se a curva analítica, seguida dos sinais das amostras.

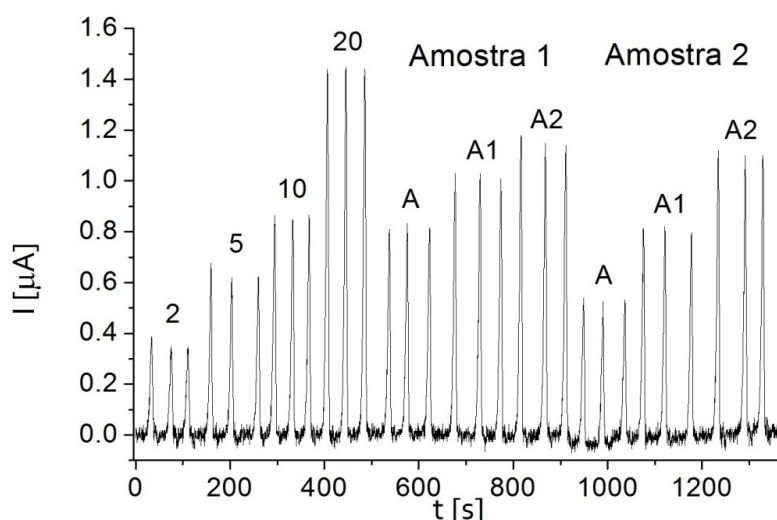


Figura 15. Amperograma FIA para injeções em triplicata de padrões de glicerol (2, 5, 10 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$) e para amostras de biodiesel (Amostra 1 e Amostra 2) sem (A) e com fortificação (A1 e A2) em dois níveis. Condições como na Figura 13. Sistema de extração 4.

A Tabela 12 apresenta os valores da recuperação com extração líquido-líquido de glicerol de biodiesel conforme Morales-Rubio *et al* [43] para as amostras 1 e 2 (sistema de extração 4). Na mesma, são apresentados os valores de C_{esperada} (adicionada), $C_{\text{observada}}$ e a recuperação correspondente, conforme Equação 3.

Tabela 12. Concentração de glicerol em duas amostras de biodiesel analisadas pelo método FIA-AMP após extração pelo Sistema 4 e os respectivos valores de recuperação (n=3).

Amostra	Glicerol em biodiesel (mmol L^{-1})		Recuperação (%)
	C_{esperada}	$C_{\text{observada}}$	
1	0	$0,93 \pm 0,03$	-
	0,39	$0,378 \pm 0,009$	98 ± 2
	0,70	$0,63 \pm 0,01$	90 ± 2
2	0	$0,50 \pm 0,07$	-
	0,39	$0,49 \pm 0,03$	126 ± 9
	0,70	$0,81 \pm 0,15$	117 ± 21

Apesar dos valores de recuperação aceitáveis obtidos na amostra 1, o mesmo não ocorreu para a amostra 2, sendo obtida uma faixa acima da estipulada, apesar do intervalo estreito, cerca de 12%.

A concentração de glicerol livre encontrado na amostra 1 corresponde a $0,34 \text{ mg g}^{-1}$ de glicerol em biodiesel, que está acima do limite máximo regulamentado pela ANP, ASTM e CEN, de $0,2 \text{ mg g}^{-1}$ [13-15]. A concentração da amostra 2 ($0,18 \text{ mg g}^{-1}$) está dentro do limite aceitável.

3.1.5.3. Sensibilidade

Conforme a Tabela 11, os coeficientes angulares das curvas analíticas variam de 0,07713 a 0,18395, sem intervalos regulares. Para um mesmo intervalo de concentração, a corrente pode variar desde 0,08 a 0,18 μA , o que indica a sensibilidade do método.

3.1.5.4. Linearidade

A Figura 16 apresenta o amperograma dos padrões de glicerol injetados em triplicata em AMP-FIA, de 100 a $1684 \mu\text{mol L}^{-1}$, no detalhe tem-se a respectiva curva analítica.

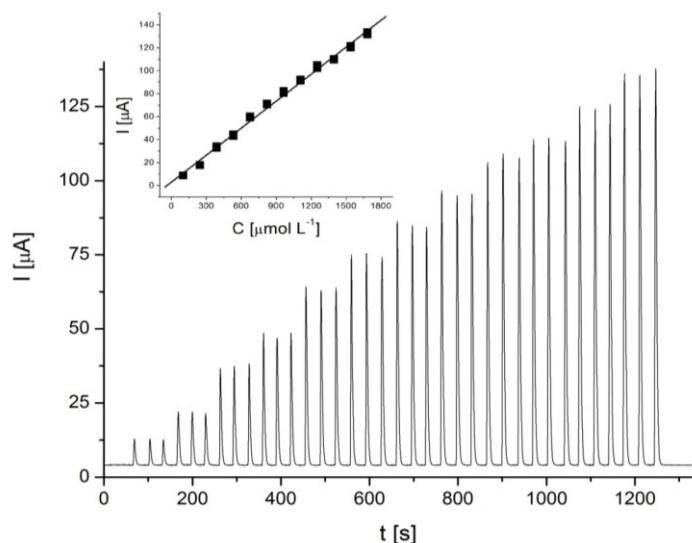


Figura 16. Amperograma e curva analítica de padrões de glicerol de 100 a 1684 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em eletrodo de ouro por AMP-FIA em meio de NaOH 0,1 mol L^{-1} . Condições como na Figura 13.

A equação da reta da curva analítica é $I[\mu\text{A}] = (2,9 \pm 0,9) + (0,0784 \pm 0,0009) \cdot C[\mu\text{mol L}^{-1}]$, com coeficiente de correlação $R = 0,9974$. Com dois novos após a vírgula, o ajuste linear é aceitável e está de acordo com as normas [136, 137].

3.1.5.5. Faixa de trabalho

A faixa de trabalho obtida vai do limite de quantificação de 49,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 2,288 mmol L^{-1} , como apresenta a Figura 17. A faixa apresentada compreende a concentração esperada na amostra, sendo o limite máximo pouco acima da concentração de glicerol numa amostra de biodiesel. Observa-se que acima de 2,0 mmol L^{-1} , a repetitividade fica prejudicada.

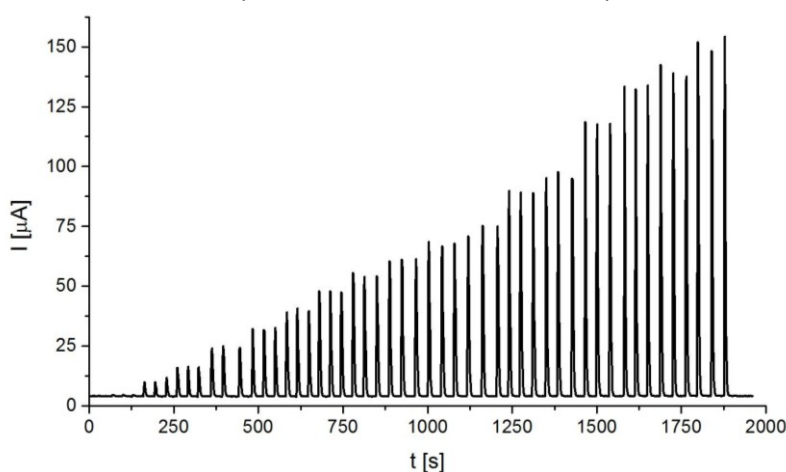


Figura 17. Amperograma de padrões de glicerol de 1 a 2288 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em eletrodo de ouro por AMP-FIA em meio de NaOH 0,1 mol L^{-1} . Condições como na Figura 13.

A média de correntes dos 17 pontos de padrões de glicerol injetados com intervalos de aproximadamente 144 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi utilizada para obtenção da curva analítica da Figura 18; o limite de quantificação se encontra dentro da faixa de padrões injetados. Foi obtido um coeficiente de correlação de 0,9909 para a seguinte equação: $I[\mu\text{A}] = (-5 \pm 3) + (0,062 \pm 0,002) \cdot C[\mu\text{mol L}^{-1}]$.

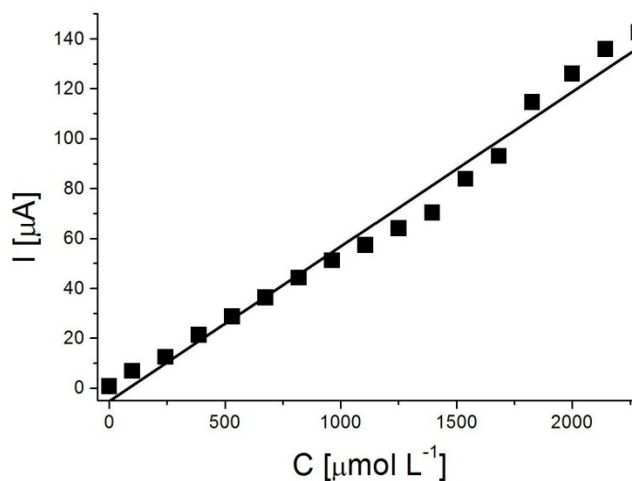


Figura 18. Curva analítica de padrões de glicerol de 1 a 2288 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em eletrodo de ouro por AMP-FIA em meio de NaOH 0,1 mol L^{-1} .

3.1.5.6. Limite de detecção

A Equação 5 foi utilizada com os valores de desvio padrão e coeficiente angular das curvas analíticas do cálculo de linearidade, realizadas em triplicata. Foi obtido LD igual a 14,73 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Este valor corresponde a 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$; 1,4 mg L^{-1} (ppm) e 0,00014 % (m/m). Comparando com os valores apresentados na Tabela 6, o método de determinação amperométrica de glicerol livre em biodiesel utilizando eletrodo de ouro em meio básico acoplado à sistema FIA tem LD próximos à métodos enzimáticos, cromatográficos e espectrofotométricos, e LD menor que dos métodos eletroquímicos já apresentados, utilizando eletrodos de platina [5], cobre [12] e grafite modificado com nano partículas de níquel [53].

3.1.5.7. Limite de quantificação

Utilizando a curva analítica do cálculo de linearidade e a Equação 6, foi obtido LQ de 49,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Valores de LQ geralmente não são apresentados na literatura, mas o valor obtido é 44 vezes menor que o estipulado pelas normas ANP 7, ASTM D 6751 e EN 14214 de 200 ppm ou cerca de 2,17 mmol L^{-1} [13-15]. Esse baixo limite de quantificação permite alta segurança na análise de glicerol biodiesel por amperometria de múltiplos pulsos.

3.1.5.8. Robustez

A possibilidade de miniaturização do método, para obter um sistema de análise portátil, por exemplo, já é um sinal de alta robustez. Técnicas eletroquímicas em geral apresentam alta robustez, o que pode ser observado na precisão intermediária: curvas analíticas obtidas em diferentes dias mantém a linearidade esperada, não prejudicando a determinação, mesmo havendo variações na inclinação da curva. A recuperação do método não foi boa devido à etapa de extração aquosa, à intensa manipulação da amostra, o que implica baixa robustez.

Então, pode-se dizer que o método é robusto, porém, melhorias nas condições de extração podem aumentar a robustez.

3.2. Eletrodo de platina

O perfil de corrente versus potencial de oxidação de glicerol em diferentes concentrações obtido por voltametria cíclica coincide com o apresentado no trabalho de Lourenço e Stradiotto [5], como mostra a Figura 19. São observados dois picos de oxidação crescentes no sentido positivo de varredura, um em 0,65 V e outro em 1,3 V. Analisando a linearidade destes sinais, obtêm-se as curvas analíticas apresentadas na Figura 20 para os dois pontos de oxidação.

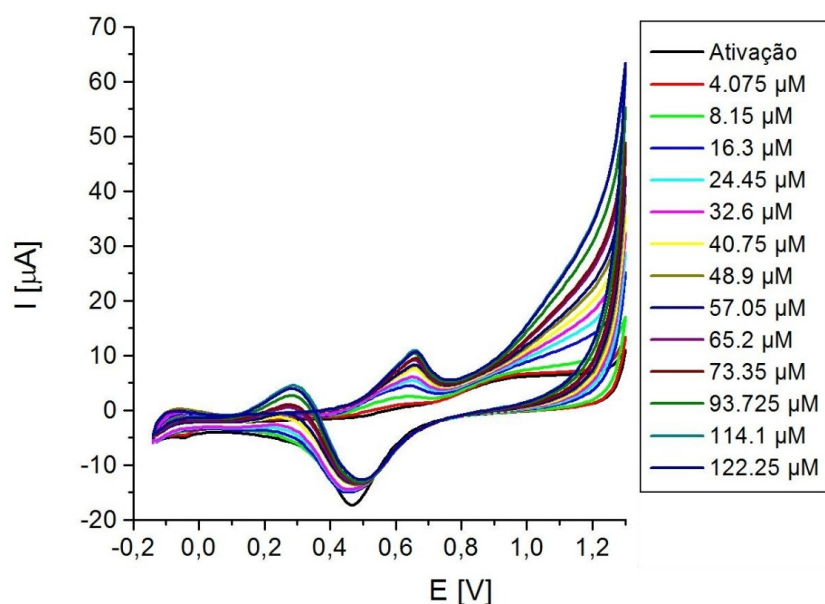


Figura 19. Voltamogramas cíclicos de concentrações crescentes de glicerol em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com eletrodo de platina.

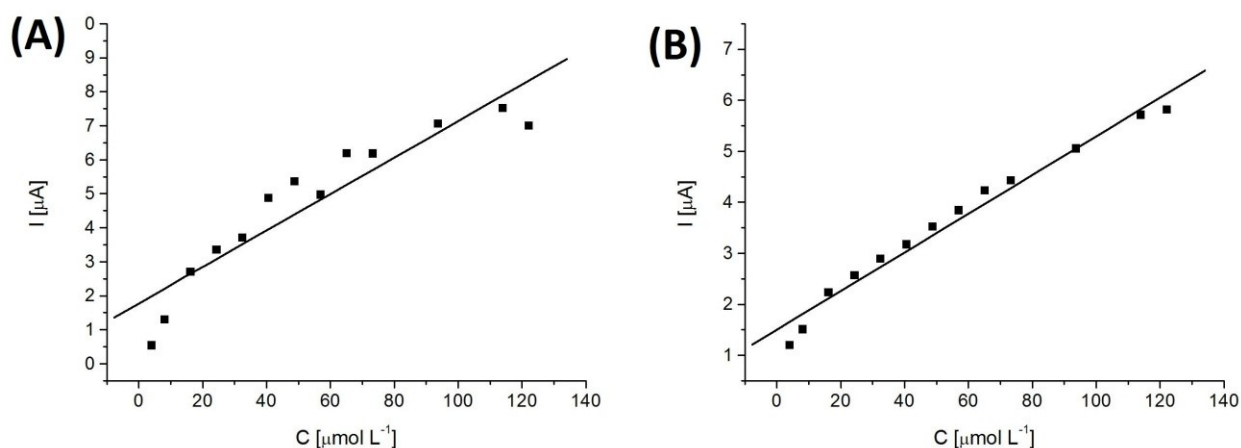


Figura 20. Curvas analíticas de padrões de glicerol de $4,075$ a $122,25 \text{ μmol L}^{-1}$ em eletrodo de platina em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Sinais de oxidação em $0,65 \text{ V}$ (A) e $1,3 \text{ V}$ (B).

Para o sinal em $0,65 \text{ V}$, Figura 20-A, foi obtida a equação de reta $I[\mu\text{A}] = (1,8 \pm 0,4) + (0,054 \pm 0,006) \cdot C[\mu\text{mol L}^{-1}]$ com coeficiente de correlação $R = 0,9312$. Para o sinal em $1,3 \text{ V}$, Figura 20-B, foi obtida a equação de reta $I[\mu\text{A}] = (1,5 \pm 0,1) + (0,038 \pm 0,002) \cdot C[\mu\text{mol L}^{-1}]$ com coeficiente de correlação R de $0,98789$.

Comparando as curvas analíticas em eletrodo de platina e ouro, o eletrodo de ouro apresenta melhores resultados. Além disso, a necessidade de ativação do eletrodo de platina a cada análise, sempre que o mesmo é imerso na solução, tornam o método demorado. Vale ressaltar que a ativação e as medidas devem ser feitas na mesma célula, sem troca de solução.

Não foram feitas análises posteriores.

3.3. Eletrodo de carbono vítreo revestido com filme de RuOHCF

A Figura 21 apresenta o perfil do filme de hexacianoferrato de óxido de rutênio (RuOHCF) nos dois eletrólitos testados: ácido perclórico e ácido sulfúrico.

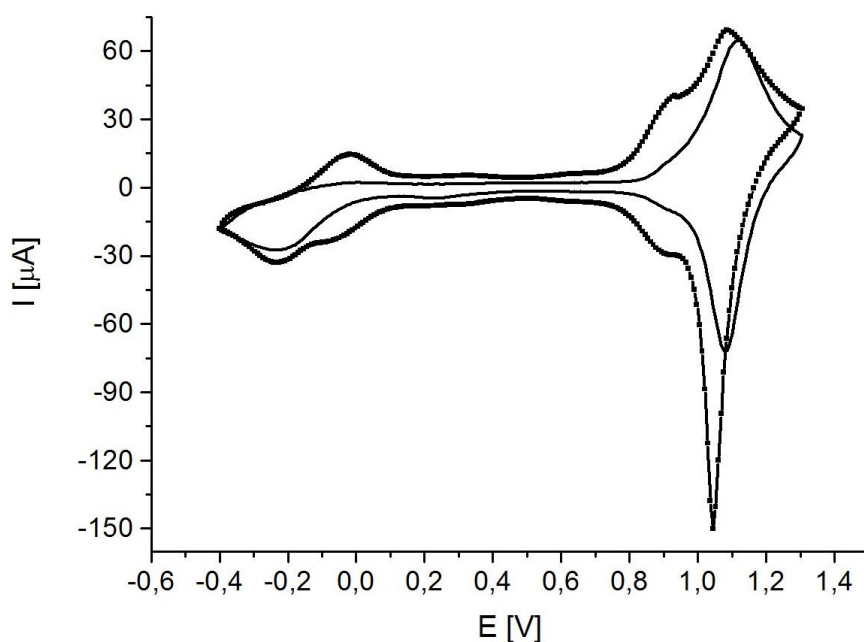


Figura 21. Voltamogramas cíclicos de eletrodo de carbono vítreo com filme de RuOHCF após 60 ciclos em ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ (—) e ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹ (—■—). Condições: varredura de -0,4 a 1,3 V; velocidade de 50 mV s⁻¹.

O perfil do filme de RuOHCF em HClO₄ é melhor definido, sendo este utilizado como eletrólito de trabalho nas análises seguintes.

Na adição de glicerol de 5 a 100 mmol L⁻¹, foram obtidos os ciclos apresentados na Figura 22. As setas indicam o sentido de varredura dos ciclos.

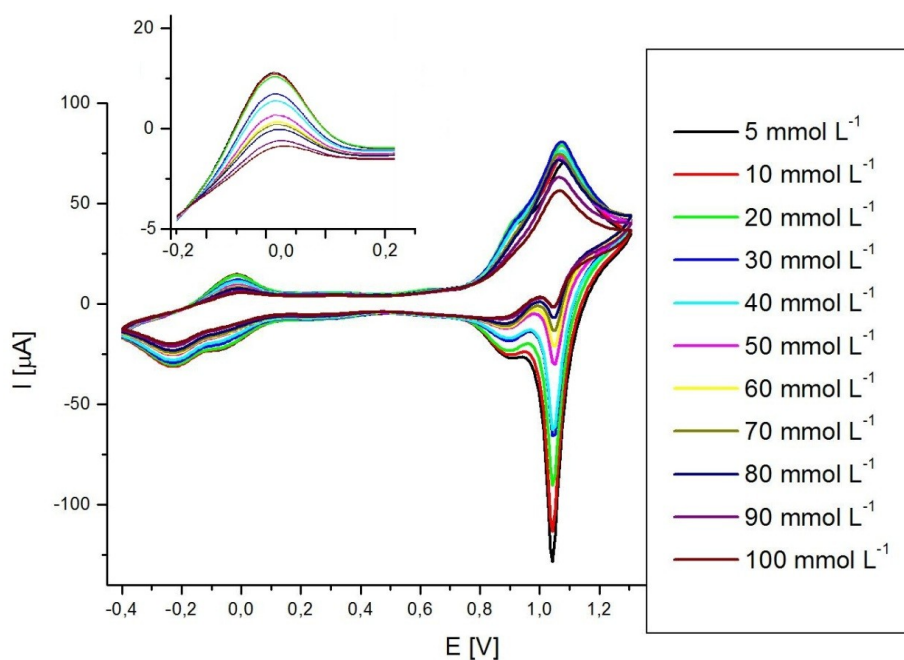


Figura 22. Voltamograma cíclico em meio de HClO₄ 0,1 mol L⁻¹ com concentrações crescentes de glicerol, de 5,0 a 100,0 mmol L⁻¹. Condições como na Figura 21.

Observa-se diminuição da intensidade de corrente de -0,2 a 0,2 V (detalhe) e de 1,2 a 0,8 V. No detalhe pode-se observar que os pares de rutênio responsáveis pela transferência de elétrons diminuem com o aumento da concentração de glicerol. Observa-se também que um grande aumento de concentração tem pouco efeito sobre a corrente, provavelmente por estar fora da faixa linear.

Como grandes concentrações de glicerol não são observadas em amostras de biodiesel, sendo o máximo permitido de $2,17 \text{ mmol L}^{-1}$, não foram feitas análises posteriores com eletrodo de carbono vítreo revestido com filme de RuOHCF.

3.4. Eletrodo de diamante dopado com boro

Dentre os seis eletrólitos testados, os sinais de menor corrente de fundo em cada faixa de potencial foram obtidos em tampão acetato (curvas vermelhas) e tampão fosfato (curvas verdes), como mostra a Figura 23.

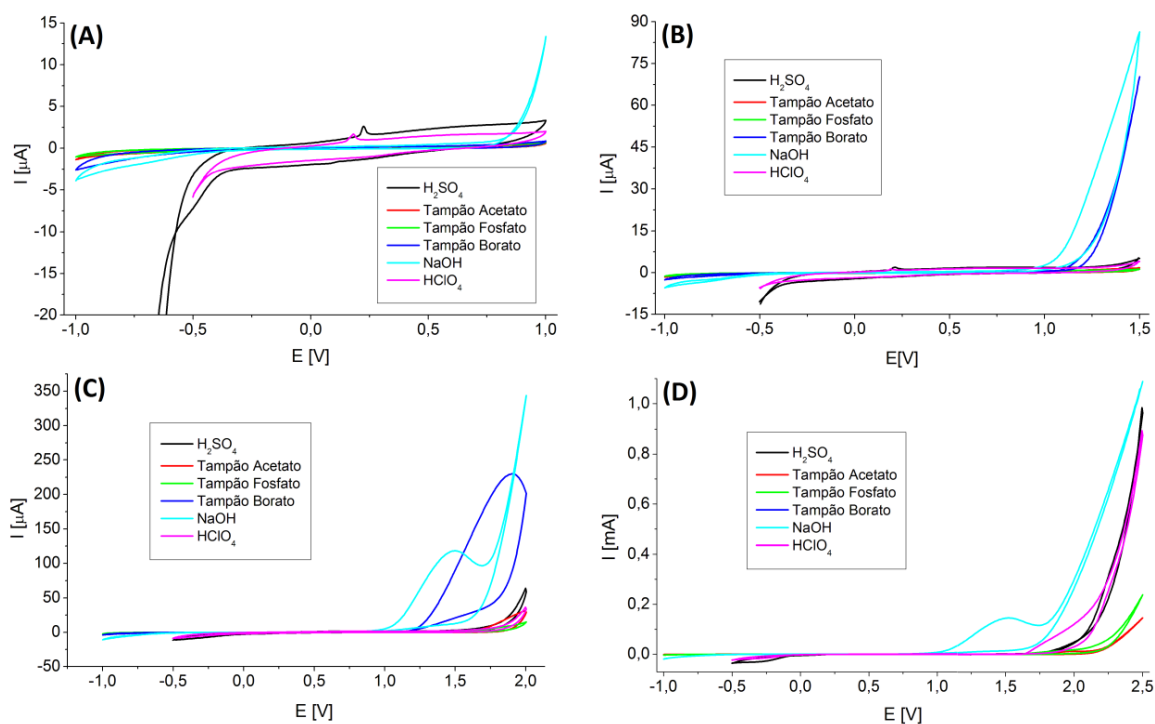


Figura 23. Voltamogramas cíclicos com eletrodo de diamante dopado com boro em seis diferentes eletrólitos e quatro faixas de potencial: -1,0 a 1,0 V (A); -1,0 a 1,5 V (B); -1,0 a 2,0 V (C) e -1,0 a 2,5 V (D).

Na menor faixa de potencial, de -1,0 a 1,0 V, os tampões acetato, borato e fosfato apresentaram menores correntes de fundo, tendo o NaOH um pico positivo de 13 μA em cerca de 0,9 V; o potencial inicial em meio de ácido sulfúrico foi reduzido de -1,0 para -0,6 V devido à alta corrente alcançada, chegando a -783 μA ; o potencial inicial em meio de ácido perclórico também foi reduzido de -1,0 para -0,5 V, eliminando a alta corrente. Aumentando o potencial no sentido positivo, até 2,5 V, apenas os tampões acetato e fosfato mantiveram corrente de fundo pequena, em cerca de 3 μA , como se observa em 23-B, 23-C e 23-D.

Após a adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicerol em meio de tampões acetato e fosfato, o analito apresentou sinal em potencial próximo ao de evolução de oxigênio, em $1,2 \text{ V}$ em tampão fosfato e em $1,7 \text{ V}$ em tampão acetato, como mostra a Figura 24. Em potenciais tão altos não é possível determinar apenas o glicerol.

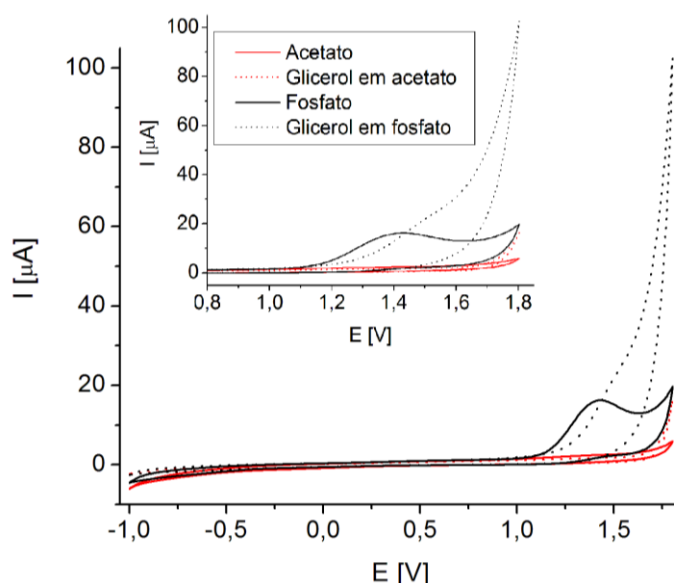


Figura 24. Voltamogramas cíclicos com eletrodo de diamante dopado com boro em meio de tampão acetato (—) e tampão fosfato (—), antes e após a adição de glicerol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Não foram feitos testes posteriores com eletrodo de diamante dopado com boro.

3.5. Eletrodos compósitos

Para o eletrodo compósito modificado com partículas de ouro, foram obtidos os voltamogramas apresentados na Figura 25.

Os sinais de maior intensidade foram obtidos em meio de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, porém, todos os eletrólitos testados degradam o compósito epóxi. Em medidas realizadas num mesmo dia tem-se boa repetitividade em cada eletrólito, porém, os dados não são comparáveis em dias diferentes, tanto no branco, como com adição de padrão de glicerol.

Não foram feitos testes posteriores utilizando eletrodos compósitos.

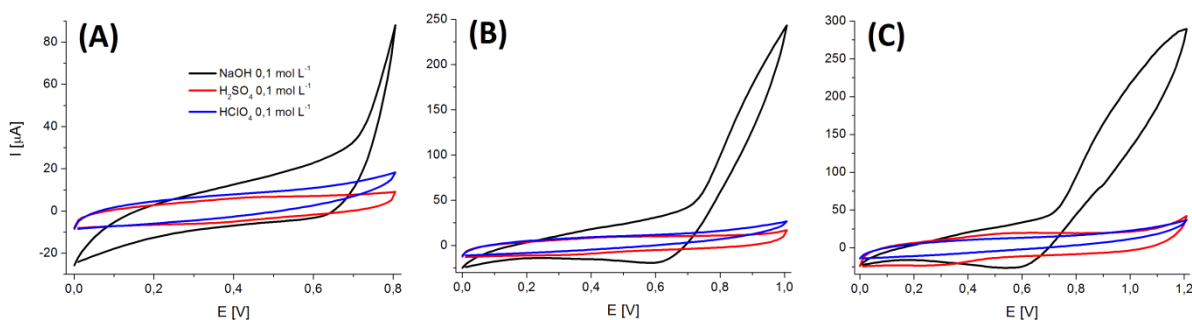


Figura 25. Voltamogramas cíclicos de eletrodo compósito modificado com partículas de ouro em meio de NaOH (—), H_2SO_4 (—) e HClO_4 (—), todos a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, nas faixas de potencial de (A) 0 a $0,8 \text{ V}$; (B) 0 a $1,0 \text{ V}$; (C) 0 a $1,2 \text{ V}$.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O método de determinação de glicerol livre em biodiesel com extração aquosa utilizando eletrodo de ouro em meio básico adaptado à célula FIA com amperometria pulsada foi obtido com algumas dificuldades, principalmente na etapa de extração aquosa. Porém, a técnica eletroquímica permitiu um aumento de sinal de corrente da oxidação de glicerol de 70 vezes comparado à amperometria a potencial constante, devido à limpeza e ativação da superfície do eletrodo durante a aplicação dos três potenciais sequenciais. O método FIA é prático, de boa sensibilidade e repetitividade, além de rápido, permitindo até 100 injeções h^{-1} . Todo o método requer apenas uma preparação simples de amostra com extração aquosa e um único reagente: NaOH como eletrólito.

O comportamento eletroquímico de glicerol em eletrodos de ouro e platina já é conhecido desde os anos 90, o que facilita o estudo do analito e a elaboração de métodos com o acoplamento de diferentes técnicas de análise, como sistema FIA e AMP. Estudos eletroquímicos de glicerol em biodiesel incluem eletrodos de trabalho de platina e cobre, e agora, eletrodo de ouro.

Este trabalho pode ser melhorado com a determinação de glicerol livre em biodiesel em fase única, sem prévia extração aquosa. Apesar de os eletrólitos serem soluções aquosas em sua maioria, misturas com solventes orgânicos também permitem a obtenção de sinal específico. Um estudo de diagrama ternário envolvendo biodiesel, eletrólito aquoso e solvente orgânico que tenha miscibilidade nos dois primeiros, permite obter pontos de concentração em que o sistema se apresenta em fase única. Obter um solvente com miscibilidade em biodiesel e eletrólito aquoso que seja não tóxico e barato é outro ponto que deve ser avaliado para manter a simplicidade do método. Outro estudo envolveria o eletrodo de trabalho adequado para o meio, sem que se atinjam os limites de evolução de hidrogênio e oxigênio, obtendo-se uma faixa de potencial de trabalho ampla e segura.

Enfim, o método obtido é apenas uma das possibilidades de determinação de glicerol livre em biodiesel por técnicas eletroquímicas e várias adaptações são possíveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANP, *Resolução ANP nº 42*. 2004, *Diário Oficial da União*.
2. Martiniano, L.d.C., *Validação de um método para determinação de metais em microemulsões de combustíveis por voltametria de redissolução*, in *Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza*. 2009, Universidade Federal da Paraíba: João Pessoa. p. 135.
3. Van Gerpen, J., *Biodiesel processing and production*. Fuel Processing Technology, 2005. **86**(10): p. 1097-1107.
4. Ma, F.R. and M.A. Hanna, *Biodiesel production: a review*. Bioresource Technology, 1999. **70**(1): p. 1-15.
5. Lourenco, L.M. and N.R. Stradiotto, *Determination of free glycerol in biodiesel at a platinum oxide surface using potential cycling technique*. Talanta, 2009. **79**(1): p. 92-96.
6. Gandhi, J., A. Wille, and A. Steinbach, *Ion Chromatographic Determination of Free and Total Glycerol in Biodiesel and Biodiesel Blends*. Lc Gc Europe, 2009: p. 8-14.
7. IEA and OMR. *Demand 2012*. 2012 [Available from: <http://omrpublic.iea.org/omrarchive/12apr12dem.pdf>].
8. OECD. *Members and partners*. 2012 [Available from: http://www.oecd.org/pages/0,3417,en_36734052_36761800_1_1_1_1_1,00.html].
9. ANP. *Dados Estatísticos Mensais*. 2012 [Available from: <http://www.anp.gov.br/?dw=8738>].
10. Fairbanks, M., *Glicerina - Crescimento do biodiesel provoca inundação no mercado de glicerina, incentivando a descobrir novas aplicações*, in *Revista Química e Derivados*. 2009.
11. Knothe, G., et al., *Manual de biodiesel*. 2006, São Paulo: Edgard Blücher.
12. Paixão, T.R.L.C. and A.H. Maruta, *Flow injection analysis of free glycerol in biodiesel using a cooper electrode as an amperometric detector*. Fuel, 2012. **91**(1): p. 187-191.
13. ASTM, *ASTM D6751 - 11b Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels*. 2003, ASTM International: West Conshohocken.
14. CEN, *EN 14214 Automotive fuels - Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines - Requirements and test methods*. 2008: Brussels. p. 15.
15. ANP, *Resolução ANP nº 7*. 2008, *Diário Oficial da União*.
16. ISO, *ISO 2879 Glycerine for industrial use -- Determination of glycerol content -- Titrimetric method*. 1975, International Standards for Business, Government and Society.
17. Pisarello, M.L., et al., *Volumetric method for free and total glycerin determination in biodiesel*. Ind. Eng. Chem. Res., 2010. **49**(19): p. 8935-8941.
18. Bailer, J. and K. de Heuber, *Enzymatic determination of glycerol on biodiesel*. Fresenius J. Anal. Chem., 1991. **186**.

19. Valdez, H.d.C., et al., *Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica*. Química Nova, 2012. **35**(3): p. 601-607.
20. Greenhill, S.J., *Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel*, S. Company, Editor. 2004, Stepan Company.
21. Bondioli, P., et al., *Vegetable oil derivatives as diesel fuel substitutes. Analytical Aspects. Note 2: Determination of free glycerol*. Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, 1992. **69**(7): p. 7-9.
22. Plank, C. and E. Lorbeer, *Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1995. **697**(1-2): p. 461-468.
23. Nguyen, N., K. Kelly, and S. Countryman, *Reliable analysis of glycerin in biodiesel using a high temperature non-metal GC column*. LC/GC North America, 2007. **26**(2): p. 60.
24. Munari, F., D. Cavagnino, and A. Cadoppi, *Determination of free and total glycerin in pure biodiesel (B100) by GC in compliance with EN 14105*. Thermo Fisher Scientific, 2007(10215): p. 8.
25. McCurry, J.D. and C.-X. Wang, *Improving the analysis of biodiesel using capillary flow technology*, in *The Application Notebook*. 2007, Agilent Technologies. p. 48-49.
26. Mittelbach, M., *Diesel fuel derived from vegetable oils, V [1]: Gas chromatographic determination of free glycerol in transesterified vegetable oils*. Chromatographia, 1993. **37**(11-12): p. 623-626.
27. Mittelbach, M., G. Roth, and A. Bergmann, *Simultaneous gas chromatographic determination of methanol and free glycerol in biodiesel*. Chromatographia, 1996. **42**(7-8): p. 431-434.
28. Hollebone, B.P., et al., *Determination of polar impurities in biodiesels using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Separation Science, 2011. **34**(4): p. 409-421.
29. Dias, A.N., et al., *Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography*. Fuel, 2012. **94**(1): p. 178-183.
30. Prados, C.P., et al., *Simultaneous gas chromatographic analysis of total esters, mono-, di- and triacylglycerides and free and total glycerol in methyl or ethyl biodiesel*. Fuel, 2012. **96**(1): p. 476-481.
31. Lozano, P., et al., *Measurement of free glycerol in biofuels*. Fresenius J. Anal. Chem., 1996. **354**: p. 319-322.
32. Hajek, M., F. Skopal, and J. Machek, *Determination of free glycerol in biodiesel*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2006. **108**(8): p. 666-669.
33. Chadha, A., S.R. Reddy, and D. Titu, *A Novel Method for Monitoring the Transesterification Reaction of Oil in Biodiesel Production by Estimation of Glycerol*. Journal of the American Oil Chemists Society, 2010. **87**(7): p. 747-754.
34. Christison, T.T., B.M. De Borja, and J.S. Rohrer, *Determination of Free and Total Glycerol in Biodiesel*. Lc Gc North America, 2011: p. 39-39.

35. Gandia, L.M., et al., *Monitoring of biodiesel production: Simultaneous analysis of the transesterification products using size-exclusion chromatography*. Chemical Engineering Journal, 2006. **122**(1-2): p. 31-40.
36. Fillieres, R., B.B. Mlayah, and M. Delmas, *Ethanolysis of rapeseed oil: quantitation of ethyl esters, mono-, di-, and triglycerides and glycerol by high performance size-exclusion chromatography*. J. Am. Oil Chem. Soc., 1995. **72**(4): p. 427-432.
37. Kittirattanapiboon, K. and K. Krisnangkura, *Separation of acylglycerols, FAME and FFA in biodiesel by size exclusion chromatography*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2008. **110**(5): p. 422-427.
38. Darnoko, D., M. Cheryan, and E.G. Perkins, *Analysis of vegetable oil transesterification products by gel permeation chromatography*. J. Liq. Chrom. Rel. Technol., 2000. **23**(15): p. 2327-2335.
39. Cole, J., J. Lefler, and C. Rui, *Fast separation of FFA, FAME and glycerol for biodiesel analysis by supercritical fluid chromatography*. LC-GC Europe, 2008.
40. D'Elia, E., et al., *Analysis of free and total glycerol in biodiesel using an electrochemical assay based on a two-enzyme oxygen-electrode system*. Electroanalysis, 2010. **22**(9): p. 995-999.
41. D'Elia, E., et al., *Analysis of free glycerol in biodiesel using an electrochemical assay based on a two-enzyme platinum microelectrode system*. Journal of Applied Electrochemistry, 2010. **40**(11): p. 2061-2063.
42. Katrlík, J., et al., *A filtration probe-free on-line monitoring of glycerol during fermentation by a biosensor device*. Enzyme and Microbial Technology, 2008. **42**(5): p. 434-439.
43. Morales-Rubio, A., et al., *Sequential spectrofluorimetric determination of free and total glycerol in biodiesel in a multicommuted flow system*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **401**(1): p. 365-371.
44. Bondioli, P. and L. Della Bella, *An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2005. **107**(3): p. 153-157.
45. de Castro, M.D.L., et al., *Flow injection analysis-based methodology for automatic on-line monitoring and quality control for biodiesel production*. Bioresource Technology, 2009. **100**(1): p. 421-427.
46. Rocha, F.R.P. and S.G. Silva, *A flow injection procedure based on solenoid micro-pumps for spectrophotometric determination of free glycerol in biodiesel*. Talanta, 2010. **83**(2): p. 559-564.
47. Halaweish, F. and E.J. Mercer, *Determination of free glycerol in biodiesel via solid-phase extraction and spectrophotometric analysis*. Journal of the American Oil Chemists Society, 2011. **88**(5): p. 655-659.
48. Knothe, G., *Rapid monitoring of transesterification and assessing biodiesel fuel quality by near-infrared spectroscopy using a fiber-optic probe*. Journal of the American Oil Chemists Society, 1999. **76**(7): p. 795-800.
49. Knothe, G., *Monitoring a progressing transesterification reaction by fiber-optic near infrared spectroscopy with correlation to ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Journal of the American Oil Chemists Society, 2000. **77**(5): p. 489-493.

50. Micke, G.A. and L.C. Gonçalves-Filho, *Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2007. **1154**(1-2): p. 477-480.
51. Li, Y., et al., *Transesterification of soybean oil and analysis of bioproduct*. Food and Bioproducts Processing, 2012. **90**(C2): p. 135-140.
52. Xie, W. and H. Li, *Hydroxyl content and refractive index determinations on transesterified soybean oil*. Journal American Oil Chemistry Society, 2006. **83**(10): p. 869-872.
53. Tehrani, R.M.A. and S.A. Ghani, *Electrocatalysis of free glycerol at a nanonickel modified graphite electrode and its determination in biodiesel*. Electrochimica Acta, 2012. **70**: p. 153-157.
54. Monteiro, M.R., et al., *Critical review on analytical methods for biodiesel characterization*. Talanta, 2008. **77**(2): p. 593-605.
55. Knothe, G., *Analyzing biodiesel: Standards and other methods*. Journal of the American Oil Chemists Society, 2006. **83**(10): p. 823-833.
56. Knothe, G., *Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel*. Transactions of the Asae, 2001. **44**(2): p. 193-200.
57. Lôbo, I.P., S.L.C. Ferreira, and R.S. da Cruz, *Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos*. Química Nova, 2009. **32**(6): p. 1596-1608.
58. Meher, L.C., D.V. Sagar, and S.N. Naik, *Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review*. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2006. **10**(3): p. 248-268.
59. Wang, J., *Analytical Electrochemistry*. 3 ed. 2006, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc. 250.
60. Bard, A.J. and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2nd ed, ed. I. John Wiley & Sons. 2000, New York.
61. Brett, A.M.O. and C.M.A. Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*. 2nd ed, ed. O.U. Press. 1994, Oxford.
62. Crow, D.R., *Principles and applications of electrochemistry*, ed. B.A. Professional. 1994, London.
63. Bekturov.Gb, O.A. Songina, and V.A. Zakharov, *Amperometric detection of vanadium (iii) and (iv) during co-occurrence*, in *Zavodskaya Laboratoriya*. 1972. p. 143-&.
64. Ramadan, A.A., P.K. Agasyan, and S.I. Petrov, *Iodometric determination of tin (ii), arsenic (iii), and antimony (iii) in each others presence in non-aqueous media with amperometric and biamperometric detection of titration end-point*. Journal of Analytical Chemistry of the Ussr, 1975. **30**(1): p. 71-74.
65. Chung, C.H. and S. Cherevko, *Gold nanowire array electrode for non-enzymatic voltammetric and amperometric glucose detection*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2009. **142**(1): p. 216-223.
66. Ju, H.X., et al., *Enantioseparation and amperometric detection of chiral compounds by in situ molecular imprinting on the microchannel wall*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(23): p. 9651-9656.
67. Kim, Y.S., et al., *Capillary electrophoresis microchip for direct amperometric detection of DNA fragments*. Electrophoresis, 2011. **32**(8): p. 913-919.

68. Smith, D.L., D.R. Jamieson, and P.J. Elving, *Direct titration of potassium with tetraphenylborate - amperometric equivalence-point detection*. Analytical Chemistry, 1960. **32**(10): p. 1253-1257.
69. Thomas, S.D., et al., *Indirect amperometric detection of aluminium by flow injection analysis using DASA as ligand*. Analytical Letters, 2005. **38**(1): p. 133-147.
70. Chaniotakis, N.A., et al., *Magnesium ion-selective electrode: optimization and flow injection analysis application*. Analytica Chimica Acta, 1997. **356**: p. 105-111.
71. Charoenraks, T., et al., *Flow injection analysis of doxycycline or chlortetracycline in pharmaceutical formulations with pulsed amperometric detection*. Talanta, 2004. **64**(5): p. 1247-1252.
72. Kawakami, M., et al., *Amperometric detection of phenol with cytochrome C-modified gold electrode using dual working electrode system*. Analytical Letters, 2005. **38**(4): p. 549-561.
73. Wei, Q., et al., *Label-free amperometric immunosensor for the detection of human serum chorionic gonadotropin based on nanoporous gold and graphene*. Analytical Biochemistry, 2011. **414**(2): p. 196-201.
74. Chailapakul, O., et al., *Review: Recent electrochemical and optical sensors in flow-based analysis*. Sensors, 2006. **6**: p. 1383-1410.
75. Carvalho, R.M., et al., *Effects of EDTA on signal stability during electrochemical detection of acetaminophen*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004. **34**: p. 871-878.
76. Kim, Y.S., et al., *Pt nanoparticle-supported multiwall carbon nanotube electrodes for amperometric hydrogen detection*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2011. **155**(1): p. 191-198.
77. Skoog, D.A., F.J. Holler, and T.A. Nieman, *Princípios de Análise Instrumental*. 5 ed, ed. Bookman. 2002, Porto Alegre.
78. Enea, O. and J.P. Ango, *Molecular structure effects in electrocatalysis - I. Oxidation of polyols (C2 - C6) on Pt and Au electrodes*. Electrochimica Acta, 1989. **34**(3): p. 391-397.
79. Kwon, Y., et al., *Electrocatalytic Oxidation of Alcohols on Gold in Alkaline Media: Base or Gold Catalysis?* J. Amer. Chem. Soc., 2011. **133**(18): p. 6914-6917.
80. Roquet, L., et al., *Kinetics and mechanisms of the electrocatalytic oxidation of glycerol as investigated by chromatographic analysis of the reaction products: potential and pH effects*. Electrochimica Acta, 1994. **39**(16): p. 2387-2394.
81. Vitt, J.E., L.A. Larew, and D.C. Johnson, *The importance of adsorption in anodic surface-catalyzed oxygen-transfer reactions at gold electrodes*. Electroanalysis, 1990. **2**(1): p. 21-30.
82. Avramov-Ivic, M.L., et al., *The electro-oxidation of glycerol on the gold(100)-oriented single-crystal surface and polycrystalline surface in 0.1 M NaOH*. J. Electroanal. Chem., 1991. **308**: p. 309-317.
83. Kahyaoglu, A., B. Beden, and C. Lamy, *Oxydation electrocatalytique du glycerol sur electrodes d'or et de platine en milieu aqueux*. Electrochimica Acta, 1984. **29**(10): p. 1489-1492.
84. de Mattos, I.L. and L. Gorton, *Filmes de metal-hexacianoferrato: uma ferramenta em química analítica*. Química Nova, 2001. **24**(2): p. 200-205.

85. Karyakin, A.A., et al., *Prussian blue based nanoelectrode arrays for H₂O₂ detection*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(2): p. 474-478.
86. Moscone, D., et al., *Construction and analytical characterization of Prussian Blue-based carbonpaste electrodes and their assembly as oxidase enzyme sensors*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(11): p. 2529-2535.
87. Shaidarova, L.G., et al., *Electrocatalytic oxidation and flow-injection determination of sulfur-containing amino acids at graphite electrodes modified with a ruthenium hexacyanoferrate film*. Journal of Analytical Chemistry, 2003. **58**(12): p. 1144-1150.
88. Paixão, T.R.L.C. and M. Bertotti, *FIA determination of ascorbic acid at low potential using a ruthenium oxide hexacyanoferrate modified carbon electrode*. J. Pharm. Biomed. Analysis, 2008. **46**: p. 528-533.
89. Paixão, T.R.L.C., et al., *Continuous monitoring of ascorbate transport through neuroblastoma cells with a ruthenium oxide hexacyanoferrate modified microelectrode*. Analyst, 2008. **133**: p. 1605-1610.
90. Paixão, T.R.L.C. and M. Bertotti, *Electrocatalytic oxidation of deoxyguanosine on a glassy carbon electrode modified with a ruthenium oxide hexacyanoferrate film*. Electrochimica Acta, 2007. **52**(5): p. 2181-2188.
91. Paixão, T.R.L.C., et al., *Flow injection amperometric detection of 2-deoxyguanosine at a ruthenium oxide hexacyanoferrate modified electrode*. Analytical Chemistry, 2007. **79**: p. 5392-5398.
92. Araújo, W.R. and T.R.L.C. Paixão, *Amperometric Detection of Ranitidine Using Glassy Carbon Modified with Ruthenium Oxide Hexacyanoferrate Adapted in a Flow Injection System*. Electroanalysis, 2011. **23**(11): p. 2549-2554.
93. Chen, S.-M., M.-F. Lu, and K.-C. Lin, *Preparation, characterization and electrocatalytic properties of ruthenium hexacyanoferrate and hybrid film modified electrodes*. J. Electroanal. Chem., 2005. **579**: p. 163-174.
94. Compton, R.G., J.S. Foord, and F. Marken, *Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes*. Electroanalysis, 2003. **15**(17): p. 1349-1363.
95. Céspedes, F., E. Martinez-Fabregas, and S. Alegret, *New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1996. **15**(7): p. 296-304.
96. Albertus, F., et al., *A PVC-graphite composite electrode for electroanalytical use. Preparation and some applications*. Analytica Chimica Acta, 1997. **355**(1): p. 23-32.
97. Aguilar, R., et al., *Capability of a carbon-polyvinylchloride composite electrode for the detection of dopamine, ascorbic acid and uric acid*. Electrochimica Acta, 2004. **49**(6): p. 851-859.
98. Klatt, L.N., et al., *Voltammetric characterization of a graphite-teflon electrode*. Anal. Chem., 1975. **47**(14): p. 2470-2472.
99. Peña, N., et al., *Graphite-Teflon composite bienzyme electrodes for the determination of cholesterol in reversed micelles. Application to food samples*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(6): p. 1190-1195.
100. Armentrout, D.N., J.D. McLean, and M.W. Long, *Trace determination of phenolic compounds in water by reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection using a carbonpolyethylene tubular anode*. Anal. Chem., 1979. **51**: p. 1039-1045.

101. Park, J. and B.R. Shaw, *Electrochemical performance of crosslinked poly(styrene)-co-poly(vinylpyridine) composite electrodes containing carbon black*. Analytical Chemistry, 1989. **61**(8): p. 848-852.
102. Ramírez-García, S., et al., *Carbon composite microelectrodes: charge percolation and electroanalytical performance*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(3): p. 503-512.
103. Moreno-Baron, L., A. Merkoçi, and S. Alegret, *Graphite-epoxy composite as an alternative material to design mercury free working electrodes for stripping voltammetry*. Electrochimica Acta, 2003. **48**(18): p. 2599-2605.
104. Barroso-Fernandez, B., et al., *Electrochemical behavior of methyl viologen at graphite electrodes modified with Nafion sol-gel composite*. Analytica Chimica Acta, 1998. **370**(2-3): p. 221-230.
105. Dai, X., et al., *Electroanalysis using macro-, micro-, and nanochemical architectures on electrode surfaces. Bulk surface modification of glassy carbon microspheres with gold nanoparticles and their electrical wiring using carbon nanotubes*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(17): p. 6102-6108.
106. Brett, A.M.O. and C.M.A. Brett, *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*, ed. L. Almedina. 1996, Coimbra.
107. Brascola. *Araldite Profissional*. Produtos 2012 [Available from: <http://www.brascola.com.br/produtos/araldite-profissional/>].
108. SILAEX. *Agentes de cura para resinas epóxi*. Conteúdo Técnico 2012 [Available from: <http://www.silaex.com.br/agentes%20de%20cura.htm>].
109. Ramírez-García, S., et al., *Carbon composite electrodes: surface and electrochemical properties*. Analyst, 2002. **127**(11): p. 1512-1519.
110. Alegret, S., *Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing. A review*. Analyst, 1996. **121**(12): p. 1751-1758.
111. Calixto, C.M.F., *Desenvolvimento e aplicação de eletrodos compósitos à base de grafite e Araldite*, in *Instituto de Química*. 2008, Universidade de São Paulo: São Carlos.
112. O'Hare, D., J.V. Macpherson, and A. Willows, *On the microelectrode behaviour of graphite-epoxy composite electrodes*. Electrochemistry Communications, 2002. **4**(3): p. 245-250.
113. Kirgöz, Ü.A., et al., *Stripping voltammetry with bismuth modified graphite-epoxy composite electrodes*. Electroanalysis, 2005. **17**(10): p. 881-886.
114. Kirgöz, Ü.A., et al., *A biosensor based on graphite epoxy composite electrode for aspartame and ethanol detection*. Analytica Chimica Acta, 2006. **570**(2): p. 165-169.
115. Tizvar, R., et al., *Optimal separation of glycerol and methyl-oleate via liquid-liquid extraction*. Journal of Chemical & Engineering Data, 2009. **54**(5): p. 1541-1550.
116. Junior, L.C.R., *Metodologia cinética em fluxo não interrompido - determinação de dopamina em fármacos*, in *Química*. 2004, Universidade Federal de Pernambuco: Recife.
117. Zagatto, E.A.G., C.C. Oliveira, and C.H. Collins, *Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações - IUPAC 1994)*. Química Nova, 1999. **22**(1): p. 143-146.

118. Junior, L.H.M., *Eletrodos voltamétricos e amperométricos para a determinação de espécie de interesse farmacêutico*, in *Departamento de Química*. 2007, Universidade Federal de São Carlos: São Carlos.
119. Matos, R.C., I.G.R. Gutz, and L. Angnes, *Propulsor pneumático versátil e isento de pulsação para sistemas de análise em fluxo*. *Química Nova*, 2001. **24**: p. 795-798.
120. Kubiak, W.W. and M.M. Strozik, *Study of the flow dependence of microelectrode and semimicroelectrode voltammetric signals*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1996. **417**: p. 95-103.
121. Huang, Y.Z., et al., *Microfluidic chip-based valveless flow injection analysis system with gravity-driven flows*. *Analyst*, 2008. **133**: p. 1237-1241.
122. Du, W.B., et al., *High-throughput nanoliter sample introduction microfluidic chip-based flow injection analysis system with gravity-driven flows*. *Analytical Chemistry*, 2005. **77**: p. 1330-1337.
123. Ruzicka, J. and E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, ed. J. Wiley. 1988, New York.
124. Bergamin, H., B.F. Reis, and E.A.G. Zagatto, *New device for improving sensitivity and stabilization in flow-injection analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 1978. **97**: p. 427-431.
125. Gimenes, D.T., *Desenvolvimento de metodologias analíticas usando FIA com detecção amperométrica: análise de dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico*, in *Química*. 2009, Universidade Federal de Uberlândia: Uberlândia. p. 82.
126. Elci, L., Z. Arslan, and J.F. Tyson, *Determination of lead in wine and rum samples by flow injection - hydride generation - atomic absorption spectrometry*. *Journal of Hazardous Materials*, 2009. **162**: p. 880-885.
127. Adam, I.S.I. and A.N. Anthemidis, *Flow injection wetting-film extraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of cadmium in environmental waters*. *Talanta*, 2009. **77**: p. 1160-1164.
128. Takayanagi, T., et al., *Preconcentration and decomposition of perfluorinated carboxylic acids on an activated charcoal cartridge with sodium biphenyl reagent and its determination at $\mu\text{g L}^{-1}$ level on the basis of flow injection-fluorimetric detection of fluoride ion*. *Talanta*, 2008. **74**: p. 1224-1230.
129. Waseem, A., M. Yaqoob, and A. Nabi, *Photodegradation and flow-injection determination of simetryn herbicide by luminol chemiluminescence detection*. *Analytical Sciences*, 2008. **24**: p. 979-983.
130. Waseem, A., M. Yaqoob, and A. Nabi, *Flow-injection method for the determination of iodide/iodine using $\text{Ru}(\text{bpy})(3)(3+)\text{-NADH}$ chemiluminescence detection*. *Luminescence*, 2008. **23**: p. 316-320.
131. Ensafi, A.A., T. Khayamian, and F. Hasanpour, *Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte by flow injection analysis with chemiluminescence detection*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008. **48**: p. 140-144.
132. LaCourse, W.R. and D.C. Johnson, *Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes*. *Analytical Chemistry*, 1990. **62**(10): p. 589 A-597 A.
133. Pedrotti, J.J., L. Angnes, and I.G.R. Gutz, *Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions*. *Electroanalysis*, 1996. **8**(7): p. 673-675.
134. Leite, F., *Validação em análise química*, ed. Átomo. 1996, Campinas.

135. Brito, N.M., et al., *Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão*. Pesticidas: R. Ecotoxicologia e Meio Ambiente, 2003. **13**: p. 129-146.
136. INMETRO, *Orientação sobre validação de métodos analíticos - Documento de caráter orientativo*. 2010, Coordenação Geral de Acreditação.
137. ANVISA, *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*, in 899, A.N.d.V. Sanitária, Editor. 2003, Diário Oficial da União.