

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação da Microextração Líquido-Líquido Dispersiva
Reversa como Estratégia para o Preparo de Amostra de
Biodiesel para Determinação de Ca, Mg, Na e K por
Espectrometria Atômica**

KÁSSIA ROBERTA NOGUEIRA DA SILVA

DOURADOS/MS

2017

KÁSSIA ROBERTA NOGUEIRA DA SILVA

**Avaliação da Microextração Líquido-Líquido Dispersiva
Reversa como Estratégia para o Preparo de Amostra de
Biodiesel para Determinação de Ca, Mg, Na e K por
Espectrometria Atômica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Raposo Junior
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marcela Zanetti Corazza

DOURADOS/MS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S586a Silva, Kássia Roberta Nogueira da.

Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva reversa como estratégia para o preparo de amostra de biodiesel para determinação de Ca, Mg, Na e K por espectrometria atômica. / Kássia Roberta Nogueira da Silva. – Dourados, MS : UFGD, 2017.

87f.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Raposo Junior.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Energia renovável. 2. Biocombustível. 3. R-DLLME.
 4. Análise estatística multivariada. 5. Metais. 6. AAS.
- I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Avaliação da Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Reversa como Estratégia para o Preparo de Amostra de Biodiesel para Determinação de Ca, Mg, Na e K por Espectrometria Atômica", de autoria de Kássia Roberta Nogueira da Silva, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.

JORGE RAPOSO JR

Prof. Dr. Jorge Luiz Raposo Junior (Orientador-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Daniele M. dos Santos

Profa. Dra. Daniele Mignolo dos Santos
Membro Examinador (UFGD)

Kelber dos Anjos de Miranda

Prof. Dr. Kelber dos Anjos de Miranda
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 24 de fevereiro de 2017.

A Deus, que está no controle de tudo e a quem confiei minha vida e o meu futuro, pois a sua vontade é boa, perfeita e agradável e à minha mãe, a quem dou o mérito por chegar aqui.

DEDICO

*“Quando contei os meus sonhos para alguém
Me disseram: são grandes demais pra você
Quando falei onde queria chegar
Me disseram: pare por aqui, não vá além
Mas com Deus foi bem diferente
Ele me disse: vá em frente eu contigo estou
Quando eu senti medo de seguir
Disse: prossiga eu te fiz pra ser um vencedor
Desde então eu nunca mais me limitei
Guardei no coração as palavras de Deus
Descobri que os planos dele para mim
São muito maiores que os meus.”*

(Leandro Borges)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma jornada concluída, por me conceder muito mais do que mereço e pelas bênçãos, provisão e proteção. Por estar ligado a mim em todos os aspectos de minha vida e pelo imenso amor que nos sopraste o fôlego de vida.

Aos meus pais, Rita Nogueira e José Roberto da Silva, pela motivação e apoio ao longo da minha caminhada e por estarem comigo em todas as circunstâncias.

Aos meus irmãos, João Pedro Nogueira e João Vitor Nogueira, por estarem sempre presentes na minha vida. Considero-os como presentes de Deus.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Luiz Raposo Jr, pelo exemplo de orientação, desde a correção minuciosa de cada redação até a grande visão como pesquisador.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Marcela Zanetti Corazza, pela grande contribuição com a análise multivariada.

A todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Química pelo conhecimento transmitido durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Dionísio Borsato da Universidade Estadual de Londrina (UEL) por realizar os testes de viscosidade cinemática nos biodieseis.

As minhas amigas Priscila Ferreira e Silmara Pontes pela amizade sincera e apoio.

Aos meus colegas do Laboratório de Espectroscopia e Cromatografia Aplicada (LECA), Daiane Matias, Anderson Greco, Márcia Generoso, Adriana Lima, Genilson de Jesus, Heberth Lee e Marciéli Karoline, pelo companheirismo.

A técnica do curso de Química, Liriana Roveda, e a sua irmã Ana Carolina Roveda, pela contribuição para obtenção dos óleos vegetais e biodiesel.

A Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia pela estrutura oferecida e apoio institucional.

A Fundect e a CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

AALLME	Microextração Líquido-Líquido Assistida por Ar, do inglês, <i>Air-Assisted Liquid-Liquid Microextraction</i>
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível
APDC	Amônio pirrolidina ditiocarbamato
AS-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva utilizando Tensoativos, do inglês, <i>Assisted Surfactants-Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE	Eletroforese Capilar, do inglês, <i>Capillary Electrophoresis</i>
Cebds	Conselho Empresarial Brasileiro para o Desenvolvimento Sustentável
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês, <i>Dispersive Liquid Liquid Microextraction</i>
DLLME-SFO	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante, do inglês, <i>Dispersive Liquid Liquid Microextraction based on Solidification of Floating Organic Drop</i>
ET AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica, do inglês, <i>Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry</i>
ETV-ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado com Vaporização Eletrotérmica, do inglês, <i>Electrothermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
SWASV	Voltametria de Onda Quadrada Redissolução Anódica, do inglês, <i>Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry</i>
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama, do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
F AES	Espectrometria de Emissão Atômica em Chama, do inglês, <i>Flame Atomic Emission Spectrometry</i>
FS-F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica Sequencial Rápido, do inglês, <i>Fast Sequential Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
HF-LPME	Microextração em Fase Líquida Suportada com Fibra Oca, do inglês, <i>Hollow Fibre-Liquid Phase Microextraction</i>
HG-AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica com Geração de Hidreto, do inglês, <i>Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry</i>
HR-CS ET AAS	Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica de Fonte Contínua de Alta Resolução, do inglês, <i>High-Resolution Continuum Source Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i>
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do

	inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
IL-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva utilizando Líquidos Iônicos, do inglês, <i>Ionic Liquids Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
LD	Limite de Detecção
LDS-SD-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com solventes de baixa densidade e quebra de emulsão com solvente, do inglês, <i>low-density Solvent-based Solvent-demulsification Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
LIBS	Espectroscopia de Separação Induzida por Laser, do inglês, <i>Laser-Induced Breakdown Spectroscopy</i>
LQ	Limite de Quantificação
LT-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva utilizando solventes de baixa toxicidade, do inglês, <i>Low Toxic Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
MA-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Micro-ondas, do inglês, <i>Microwave Assisted-Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
MIP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas, do inglês, <i>Microwave Induced Plasma with Optical Emission Spectrometry</i>
PVC	Policloreto de Vinila
R-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Reversa, do inglês, <i>Reverse-Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>
SPCnAuEs	Eletrodo de Carbono Impresso Nanoestruturado com Ouro, do inglês, <i>Gold nanostructures screen-printed carbon electrodes</i>
SWIA	Injeção em etapas, do inglês, <i>Stepwise Injection</i>
TIL-DLME	Microextração em Fase Líquida Dispersiva Líquido Iônico e Temperatura Controlada, do inglês, <i>Temperature Controlled Ionic-Liquid Dispersive Liquid Phase Microextraction</i>
UA-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Ultrassom, do inglês, <i>Ultrasound Assisted-Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
UV-Vis	Espectrofotometria no Ultravioleta-Visível, do inglês, <i>Ultraviolet-Visible Spectroscopy</i>
VALLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Vórtex, do inglês, <i>Vortex Assisted Liquid-Liquid Microextraction</i>
WCAES	Espectrometria de Emissão Atômica de Bobina de Tungstênio, do inglês, <i>Tungsten Coil Emission Spectrometry</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Ácidos graxos e ésteres metílicos encontrados nos óleos vegetais e biodieseis.	18
Tabela 2.	Aplicações da DLLME e suas modificações para determinação de espécies inorgânicas em diferentes matrizes.	30
Tabela 3.	Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de Ca, Mg, Na e K em biodieseis por espectrometria atômica.	40
Tabela 4.	Quantidade de óleo vegetal extraído das espécies canola, crambe, girassol e pinhão-manso utilizando o sistema de extração em <i>soxhlet</i> .	47
Tabela 5.	Massa de biodiesel obtido por catálise alcalina e rota metílica para os óleos vegetais estudados.	48
Tabela 6.	Parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de biodiesel.	49
Tabela 7.	Planejamento fatorial completo 2^4 utilizado para otimizar os parâmetros experimentais da R-DLLME para a determinação de Ca, Mg, Na e K.	53
Tabela 8.	Matriz de experimentos do planejamento <i>Doehlert</i> utilizada para estabelecer as condições experimentais da R-DLLME para a determinação de Ca, Mg, Na e K. Os números entre parênteses referem-se aos valores codificados.	57
Tabela 9.	Análise da variância aplicada aos resultados experimentais descritos na Tabela 8 para determinação de Ca.	59
Tabela 10.	Análise da variância aplicada aos resultados experimentais descritos na Tabela 8 para determinação de Mg.	59
Tabela 11.	Análise da variância aplicada aos resultados experimentais descritos na Tabela 8 para determinação de Na.	60
Tabela 12.	Análise da variância aplicada aos resultados experimentais descritos na Tabela 8 para determinação de K.	60
Tabela 13.	Parâmetros de confiabilidade analítica relativos à determinação de Ca, Mg, Na e K em amostras de biodiesel utilizando os parâmetros descritos na Tabela 3.	63
Tabela 14.	Determinação dos metais Ca, Mg, Na e K em amostras de biodiesel e seus respectivos limites de detecção.	64
Tabela 15.	Recuperações obtidas para Ca, Mg, Na e K utilizando a R-DLLME como procedimento de preparo de amostra e determinação por F AAS e F AES.	65
Tabela 16.	Resultados (média \pm desvio padrão) da determinação ($n=3$) do teor de Ca, Mg, K e Na (mg kg^{-1}) em amostras de biodiesel utilizando o procedimento de preparo de amostra por R-DLLME.	66
Tabela 17.	Resultados comparativos para a determinação de Ca e Mg em amostras de biodiesel de canola e girassol.	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reação de transesterificação típica de conversão de triglicerídeos em ésteres monoalquílicos de ácidos graxos (biodiesel). 17
- Figura 2.** Diagrama representativo que demonstra as etapas básicas de um procedimento utilizando a DLLME. 28
- Figura 3.** Foto ilustrativa do espectrômetro de absorção atômica em chama AA 240FS. 40
- Figura 4.** Foto ilustrativa das sementes oleaginosas processadas em moinho: (a) canola, (b) crambe, (c) pinhão-manso e (d) girassol. 42
- Figura 5.** Foto ilustrativa do sistema montado para a extração dos óleos vegetais em sistema *soxhlet*. 42
- Figura 6.** Etapas para obtenção do biodiesel por meio da reação de transesterificação: (a) adição da solução aquecida de metóxido de potássio ao óleo vegetal (b) separação das fases biodiesel e glicerol (c) descarte do glicerol, (d) lavagem do biodiesel com solução saturada de NaCl e (e) biodiesel bruto obtido. 43
- Figura 7.** Foto ilustrativa da amostra de óleo de canola (1) e pinhão-manso (2) após serem submetidas ao processo de degomagem. A fase sedimentada e destacada em vermelho corresponde à fração que contém fosfatídeos, proteínas e substâncias mucilaginosas. 48
- Figura 8.** Placas cromatográficas eluídas com hexano:éter etílico:ácido acético [8:2:1 (v/v/v)] e reveladas com vapor de iodo: (a) óleo e biodiesel de canola, (b) óleo e biodiesel de crambe, (c) óleo e biodiesel de girassol e (d) óleo e biodiesel de pinhão-manso. 51
- Figura 9.** Diagrama de Pareto gerado a partir do planejamento fatorial completo 2^4 para a determinação de (a) Ca, (b) Mg, (c) Na e (d) K por F AAS e F AES ($p < 0,05$). 54
- Figura 10.** Gráfico de valores preditos vs valores observados obtidos para a determinação de (a) Ca, (b) Mg, (c) Na e (d) K. 56
- Figura 11.** Superfície de resposta obtida para a interação entre volume vs $[HNO_3]$ vs recuperação na otimização do processo de determinação de (a) Ca, (b) Mg, (c) Na e (d) K. 58
- Figura 12.** Curvas analíticas típicas obtidas para Ca em 422,7 nm (a), Mg em 285,2 nm (b), K em 766,5 nm (c) e Na em 589,0 nm (d) sob as condições descritas na Tabela 3. 62

RESUMO

Procedimentos de preparo de amostra que utilizam a mínima manipulação experimental têm sido uma tendência atual na análise química elementar. Neste sentido, uma estratégia de preparo de amostra baseado na microextração líquido-líquido dispersiva reversa (R-DLLME) para a determinação de Ca, Mg, Na e K em amostras de biodiesel foi desenvolvida neste trabalho. Sementes de canola (*Brassica napus* L.), crambe (*Crambe Hochst abyssinica*), girassol (*Helianthus annuus*) e pinhão-manso (*Jatropha curcas*) foram utilizadas como matéria-prima para extração de óleo vegetal e produção de biodiesel. Além da determinação elementar, outros parâmetros físico-químicos baseados na Portaria ANP 45/2014 também foram avaliados para agregar mais informações sobre a qualidade dos biodieseis produzidos. Para determinar os elementos selecionados, as amostras de biodieseis foram submetidas ao preparo utilizando a R-DLLME. Foram avaliadas, com auxílio da análise estatística multivariada, as variáveis: massa de amostra, volume da solução extratora, composição da solução extratora e concentração de HNO₃. O volume da solução extratora e a concentração do ácido nítrico na composição da solução extratora foram as variáveis que mais influenciaram na R-DLLME para Ca, Mg, Na e K em amostras de biodiesel, ao nível de 95% de confiança. A precisão e a exatidão da R-DLLME foram avaliadas com o padrão organometálico em biodiesel B100 utilizando as condições de ≈3,0 g de amostra, 780 µL da solução extratora, 5,0% (v/v) de HNO₃:álcool isopropílico [3:1 (v/v)], banho Maria em 80 °C, 30 s de agitação da amostra *vórtex*, 3 min de sonicação e 15 min de centrifugação a 3600 rpm. Recuperações entre 91,61 - 96,56% foram obtidas para os elementos com desvios padrão relativos (%RSD) inferior a 5,36%. O método proposto foi aplicado às amostras de biodieseis selecionadas e os teores determinados foram de 0,9171 ± 0,0068 - 1,4562 ± 0,0337 mg kg⁻¹ Ca, 0,0178 ± 0,0008 - 0,0576 ± 0,0009 mg kg⁻¹ Mg, 0,4242 ± 0,0228 - 9,5958 ± 0,2963 mg kg⁻¹ Na e 0,1097 ± 0,0010 - 2,6856 ± 0,0519 mg kg⁻¹ K. Limites de detecção de 0,0143 mg kg⁻¹ (Ca), 0,0015 mg kg⁻¹ (Mg), 0,0008 mg kg⁻¹ (Na) e 0,0009 mg kg⁻¹ (K). RSD inferiores a 8,4% foram obtidos. Foi demonstrado que a técnica analítica de determinação apresenta sensibilidade satisfatória e pode ser empregada para a determinação destes elementos em amostras de biodiesel.

Palavras-chave: Energia renovável, biocombustível, R-DLLME, análise estatística multivariada, metais, AAS.

ABSTRACT

Sample preparation procedures that use a minimum experimental manipulation have been a current trend in elemental chemical analysis. In this sense, a sample preparation strategy based on the reverse-dispersive liquid-liquid microextraction (R-DLLME) for the determination of Ca, Mg, Na and K in biodiesel samples was developed in this work. Seeds of canola (*Brassica napus* L.), crambe (*Crambe Hochst abyssinica*), sunflower (*Helianthus annuus*) and jatropha (*Jatropha curcas*) were used as raw material for the extraction of vegetable oil and biodiesel production. In addition to the elemental determination, other physicochemical parameters based of the ANP 45/2014 were also carried out to aggregate more information on the quality of the biodiesel produced. To determine the selected elements, the biodiesel samples were submitted to sample preparation using R-DLLME. The following variables were evaluated using the multivariate statistical analysis: sample mass, volume of the extraction solution, composition of the extraction solution and nitric acid concentration. The volume of the extraction solution and nitric acid concentration in the extraction solution composition were the variables that most influenced to obtain satisfactory results in R-DLLME for Ca, Mg, Na and K in biodiesel samples at the 95% confidence level. The accuracy and precision of R-DLLME were evaluated with the organometallic standard in B100 biodiesel using the conditions of ≈ 3.0 g of sample, 780 μL of the extraction solution, 5.0% (v/v) HNO_3 :isopropyl alcohol [3:1 (v/v)], thermostatic bath at 80 ° C, 30 s vortex sample agitation, 3 min in ultrasonic bath and 15 min centrifuge at 3600 rpm. Recoveries between 91.61 - 96.56% were obtained for the elements with relative standard deviations (% RSD) less than 5.36%. The proposed method was applied to the selected biodiesel samples and the contents determined were 0.9171 ± 0.0068 - 1.4562 ± 0.0337 mg kg^{-1} Ca, 0.0178 ± 0.0008 - 0.0576 ± 0.0009 mg kg^{-1} Mg, 0.4242 ± 0.0228 - 9.5958 ± 0.2963 mg kg^{-1} Na and 0.1097 ± 0.0010 - 2.6856 ± 0.0519 mg kg^{-1} K. Limits of detection of 0.0143 mg kg^{-1} (Ca), 0.0015 mg kg^{-1} (Mg), 0.0008 mg kg^{-1} (Na) and 0.0009 mg kg^{-1} (K). (RSD) less than 8.4% were obtained. It was demonstrated that the analytical determination technique has satisfactory sensitivity and can be used to determine these elements in biodiesel samples.

Keywords: Renewable energy, biofuel, R-DLLME, multivariate statistical analysis, metals, AAS.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1	Biodiesel: combustível alternativo e renovável.....	17
3.2	Matérias-primas para a produção de biodiesel	19
3.2.1	Canola	19
3.2.2	Crambe.....	20
3.2.3	Girassol.....	21
3.2.4	Pinhão-manso	21
3.3	Composição química elementar do biodiesel.....	21
3.4	Procedimentos de preparo de amostras para determinação de metais	23
3.4.1	Digestão ácida	23
3.4.2	Diluição com solventes orgânicos	24
3.4.3	Emulsão e Microemulsão	25
3.4.4	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva.....	27
3.5	Técnicas espectroanalíticas aplicadas à determinação de metais	34
3.6	Análise estatística multivariada	36
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	39
4.1	Instrumentação e acessórios	39
4.2	Reagentes e soluções analíticas	40
4.3	Amostragem e preparo de amostras	41
4.4	Processo de obtenção do biodiesel.....	43
4.5	Caracterização físico-química e cromatográfica do biodiesel	44
4.6	Método para determinação de Ca, Mg, Na e K em biodieseis por F AAS e F AES	45
4.6.1	Avaliação da análise estatística multivariada na otimização dos parâmetros de extração da R-DLLME	45
4.6.2	Aplicação da R-DLLME em amostras de biodiesel	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Extração do óleo vegetal e produção de biodiesel	47
5.2	Caracterização físico-química do biodiesel.....	49
5.3	Análise estatística multivariada aplicada na otimização da R-DLLME.....	52

5.4	Método para determinação de Ca, Mg, Na e K em biodiesel por F AAS e F AES	61
5.5	Determinação de Ca, Mg, Na e K em biodiesel	66
6	CONCLUSÕES	68
7	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Grandes quantidades de recursos naturais são consumidas para promover a energia global, e por apresentar fácil armazenamento e transporte [1], os combustíveis fósseis são responsáveis por mais de 80% do consumo mundial de energia primária [2-4]. No entanto, a Comunidade Europeia já estabeleceu metas para 2020 incentivando a redução do uso de combustíveis fósseis por meio da substituição gradativa destes por biocombustíveis derivados de biomassa renovável [5-8]. Já no Brasil, o Conselho Empresarial Brasileiro para o Desenvolvimento Sustentável (Cebds) lançou em 2014 o programa Ação 2020, que objetiva elevar para 50% a participação de energias renováveis na matriz energética nacional [9].

Diante de incertezas observadas no contexto da economia mundial e no setor energético e da instabilidade política de alguns países que são importantes produtores de matéria-prima [8], a comunidade científica tem buscado fontes alternativas de biomassa renovável para produção de energia [10]. Além disso, a diminuição das reservas de petróleo, o aumento na emissão de poluentes, e preocupações com a proteção ambiental e segurança alimentar também têm contribuído para essa busca [10].

Os combustíveis derivados de petróleo e gás natural podem ser substituídos, de forma parcial ou total, por biocombustíveis derivados de biomassa renovável, cujo destaque são para aqueles obtidos a partir da cana-de-açúcar, do óleo vegetal e de outras matérias orgânicas. Com a substituição, objetiva-se promover o desenvolvimento econômico rural, suavizar as alterações climáticas e a insegurança no abastecimento de energia [11], além de contribuir com o desenvolvimento sustentável nas áreas ambiental, social e econômica [12].

A comunidade mundial considera o Brasil como um país privilegiado por apresentar uma grande biodiversidade e uma vasta riqueza de plantas oleaginosas [13]. Na realidade, é um dos países que apresenta o maior potencial para produzir combustíveis a partir da biomassa, no entanto, explora menos de um terço de sua área agriculturável [14]. Pesquisas sobre combustíveis alternativos e renováveis são realizadas desde a década de 20, mas há poucos anos os biocombustíveis passaram a ser testados em centros urbanos [15].

Para que uma ou mais espécies oleaginosas possam ser usadas como matéria-prima na obtenção do biodiesel, a ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível) [16] estabeleceu padrões para o controle de qualidade do biodiesel para assegurar que este produto apresente qualidade satisfatória. Dentre os diversos parâmetros que conferem a qualidade do biodiesel produzido, determinar a composição inorgânica tem

relevância porque contribui para avaliar a qualidade do biodiesel produzido, uma vez que os metais podem degradar o biodiesel e peças dos motores e causar danos ambientais. Desta maneira, a espectrometria atômica é uma técnica analítica instrumental que permite determinar os constituintes inorgânicos com elevada seletividade, simplicidade, rapidez e caráter multielementar, sendo amplamente utilizada na determinação destas espécies, sobretudo dos metais Ca, Mg, Na e K, uma vez que estes elementos são avaliados no controle de qualidade do biodiesel (ANP 45/2014) [17].

Neste contexto, determinar o teor de Ca, Mg, Na e K em biodiesel produzido a partir de espécies oleaginosas alternativas torna-se de extrema importância, uma vez que auxilia no controle de qualidade dos biodieseis. Por isso, o objetivo deste estudo foi estabelecer um procedimento de preparo de amostra baseado na microextração líquido-líquido dispersiva reversa (R-DLLME) para a determinação de Ca, Mg, Na e K em biodiesel obtido a partir de espécies oleaginosas alternativas empregando a espectrometria atômica em chama.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi determinar os teores de Ca, Mg, Na e K em biodiesel produzido a partir das espécies oleaginosas alternativas canola (*Brassica napus* L.), crambe (*Crambe Hochst abyssinica*), girassol (*Helianthus annuus*) e pinhão-manso (*Jatropha curcas*). Para isso as seguintes metas fazem parte do trabalho:

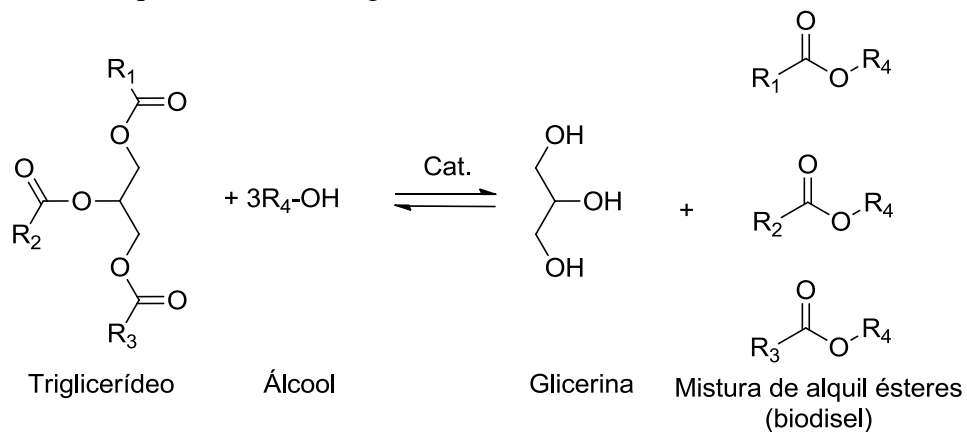
- a) Avaliar o rendimento de extração do óleo vegetal das espécies oleaginosas utilizando o método de extração por *soxhlet* e a reação de transesterificação metálica via catálise alcalina na produção de biodiesel,
- b) Determinar as propriedades físico-químicas dos biodieseis, com base em alguns parâmetros de qualidade estabelecidos pela ANP,
- c) Estabelecer as condições de melhor sensibilidade para a determinação de Ca, Mg, Na e K em espectrometria atômica, cuja avaliação deve ser feita obtendo os principais parâmetros de confiabilidade analítica,
- d) Otimizar os parâmetros de extração para o procedimento de preparo de amostra utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva reversa com auxílio da análise estatística multivariada,
- e) Aplicar a metodologia estabelecida para a determinação Ca, Mg, Na e K em amostras de biodiesel bruto de canola, crambe, girassol e pinhão-manso.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biodiesel: combustível alternativo e renovável

O biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e não tóxico derivado de fontes como óleos vegetais e gordura animal [18-23] ou até mesmo de óleo de fritura residual e algas [24]. Trata-se de um alquil éster de ácidos graxos obtidos através da reação de transesterificação destes com alcoóis de cadeia curta (p.ex. metanol ou etanol) na presença de um catalisador ácido ou básico [19,25,26], como pode ser observado na Figura 1. Nestas reações catalisadores homogêneos (H_2SO_4 e $NaOH$), heterogêneos (KOH / Al_2O_3 , WO_x / ZrO_2) [27], enzimáticos (Novozym 435) [28,29] são frequentemente utilizados, ou ainda, a reação pode ser feita de forma não-catalítica, ou seja, uma reação de transesterificação supercrítica [29]. Além das reações de transesterificação, o biodiesel também pode ser obtido por meio do craqueamento térmico de óleos e gorduras, em que moléculas de triglicerídeos são quebradas e obtêm-se hidrocarbonetos [30].

Figura 1. Reação de transesterificação típica de conversão de triglicerídeos em ésteres monoalquílicos de ácidos graxos (biodiesel).



Fonte: Próprio Autor.

Utilizar o biodiesel, ao invés do diesel, na produção de energia pode significar uma redução de 48% na emissão de monóxido de carbono, 47% de material particulado, 67% de hidrocarbonetos, e eliminar a emissão de óxido e sulfato de enxofre [31]. Com relação ao dióxido de carbono emitido durante a combustão do biodiesel, este pode ser absorvido por plantas utilizadas como matéria-prima na produção do biodiesel. Dessa forma, pode-se observar que as etapas do ciclo do carbono são concluídas, o que permite contribuir para a

redução do efeito estufa [32], uma vez que o biodiesel produz 78% menos CO₂ quando comparado ao diesel [33]. Por isso é um combustível alternativo sustentável e traz benefícios ambientais [33,34], além de não ser inflamável e não ser explosivo [35].

O biodiesel possui de 4 a 8 ésteres metílicos como constituintes majoritários, destacando-se o miristato (C15:0), palmitato (C17:0), estearato (C19:0), oleato (C19:1), linoleato (C19:2) e linolenato (C19:3) [36]. Devido à presença de insaturações dos ésteres que o formam, o biodiesel sofre oxidação e os produtos residuais formados, como gomas insolúveis e aldeídos, podem causar problemas no motor [37]. A Tabela 1 apresenta a fórmula estrutural dos ácidos graxos e ésteres metílicos presentes no biodiesel [36].

Tabela 1. Ácidos graxos e ésteres metílicos encontrados nos óleos vegetais e biodieseis.

Ácido graxo	Fórmula estrutural	
	Ácido graxo	Éster metílico
Caprílico (C8:0)		
Cáprico (C10:0)		
Láurico (C12:0)		
Mirístico (C14:0)		
Palmítico (C16:0)		
Estearico (C18:0)		
Oleico (C18:1)		
Linoleico (C18:2)		
Linolenico (C18:3)		
Erúxico (22:1)		

Fonte: Thangaraja (2016) [36].

O biodiesel pode ser utilizado em blendas (misturas) com o diesel para motores à diesel, em que a composição da mistura é indicada por Bx, e o “x” representa a porcentagem de biodiesel (v/v), como por exemplo, B100 refere-se ao biodiesel puro e o B0, ao diesel puro [38]. O combustível diesel atualmente comercializado no Brasil é uma mistura de diesel mineral com 7,0% (v/v) de biodiesel (B7) [39]. De acordo com a Legislação Brasileira, a partir de 2017, será obrigatória a adição de 8,0% (v/v) de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final [40], e em março de 2019, o teor de biodiesel será elevado a 10% (v/v) (B10) [39].

3.2 Matérias-primas para a produção de biodiesel

Há quatro caminhos para reduzir a viscosidade de óleos vegetais, e estes são feitos por meio de reações de transesterificação, pirólise, diluição com combustível à base de petróleo e produção de sistemas de emulsificação ou microemulsão [41,42]. Dentre esses métodos, a transesterificação é a alternativa mais utilizada para esta finalidade, e como produto de interesse, obtém-se o biodiesel [41,42]. As matérias-primas utilizadas para a produção do biodiesel são: soja, coco, palma, girassol, pinhão-mansão, canola [43], algodão, milho, nabo forrageiro, tungue, crambe [44], sebo bovino e ovino, óleo de aves, óleo de peixe, amêndoa, andiroba, babaçu, cevada, copra, cumaru, camelina, amendoim, louro, aveia, pequi, arroz [45], macroalgas marinhas, espécies fúngicas [46], cianobactérias [47] e semente de uva [48]. Também podem ser utilizados óleos e gorduras residuais provenientes de atividades domésticas, comerciais e industriais [44]. Algumas espécies oleaginosas como canola, crambe, girassol e pinhão-mansão merecem destaque e serão apresentadas a seguir.

3.2.1 Canola

Canola (*Brassica napus* L.) faz parte da família *Brassicaceae* e é uma das espécies *Brassica* mais cultivada no mundo [49]. Os grãos de canola possuem de 38 - 46% de óleo, 24 - 27% de proteína, enquanto o farelo apresenta o teor de proteína de 34 - 38% [50] com ampla aplicação na produção de antibióticos, biopesticidas, vitaminas e outros produtos bioquímicos [51]. Já o óleo de canola é excelente para nutrição humana devido à composição de ácidos graxos poli-insaturados que são essenciais para o organismo humano e não são sintetizados pelo mesmo [52]. O nome canola é derivado de **CAN**adian **Oil Low Acid**, que veio do nome original *low-erucic acid rapeseed oil* e significa óleo de colza com baixo teor de ácido erúico [52].

Esse óleo foi desenvolvido no Canadá, em meados de 1970, por meio de programas de melhoramento do óleo de colza [49], em que difere deste por possuir menos de 2% de ácido erúxico e baixos níveis de glucosinolatos ($<30 \mu\text{mol g}^{-1}$ na farinha). O óleo de canola é um dos óleos vegetais que apresenta o maior teor de ácido oleico (~65%), na forma de trioleato de glicerina [53], baixo nível de ácidos graxos saturados (7,36%) e níveis intermediários de ácidos graxos poli-insaturados (28%) [54]. Além disso, apresenta elevada quantidade de ômega-3 e vitamina E [50] e o menor teor de gordura saturada de todos os óleos vegetais [52].

Além do óleo de canola ser muito utilizado na alimentação por ser indicado por médicos e nutricionistas, este também é aplicado na produção de biodiesel, com grãos que sofreram excesso de chuva na colheita, seca ou outros fatores que comprometeram a qualidade para comercialização [52].

3.2.2 Crambe

Crambe (*Crambe Hochst abyssinica*) é uma erva anual da família *Cruciferae* e teve origem na região mediterrânea [55]. Apresenta um teor de óleo de aproximadamente 38%, sendo que este contém níveis elevados de ácido erúxico (50-60%), sendo este um ácido graxo monoinsaturado que apresenta 22 átomos de carbono [56] e é aplicado nas indústrias farmacêutica, cosmética, de lubrificantes e de plásticos [57,58]. O óleo de crambe, por sua vez, não é comestível, pois pode causar lesões no coração e perturbação em processos fisiológicos de animais [59], além de ser utilizado como agente inibidor de corrosão, na fabricação de borracha sintética, nylon e adesivos [60]. Recentemente este óleo tem sido aplicado na produção de biodiesel [61].

São conhecidas cerca de 35 espécies desse gênero distribuídas em quatro regiões geográficas: Macaronesia, Mediterrâneo, Leste da África e Eurosiberia-sudoeste asiático [62]. A planta pode ter de 1 a 2 m de altura e as sementes esféricas apresentam diâmetro de 0,8 a 2,6 mm [57]. Devido à robustez, cultivo precoce, resistência à seca, pestes e doenças, a manutenção desta cultura pode ser feita com os mesmos implementos utilizados em culturas tradicionais, como a soja [63]. A umidade ideal para a cultura de crambe deve ser de 14% [64] e seu ciclo de vida é curto, uma vez que a florescência ocorre entre 40-50 dias e a maturação das sementes entre 75-90 dias [65].

3.2.3 Girassol

O girassol (*Helianthus annuus* L.) pertence à família *Compositae*, e é uma dicotiledônea anual originária do continente Norte Americano [66]. Neste gênero há 49 espécies e 19 subespécies, sendo 12 espécies anuais e 37 perenes [67]. É uma espécie oleaginosa que apresenta maior resistência à seca, ao frio e ao calor do que a maioria das espécies cultivadas no Brasil, e a duração do ciclo de produção do girassol varia de 90 a 130 dias para os cultivares precoces e tardios, respectivamente [66].

As sementes de girassol são utilizadas na produção de óleo, produtos alimentícios e alimento para animais [68]. Além disso, a farinha de girassol contém elevado teor de proteína (40 - 66%) e é utilizada na alimentação animal [68]. O óleo, por sua vez, tem uma alta razão de ácidos graxos poli-insaturados/saturados (65/11%), o que lhe proporciona excelentes características nutricionais e funcionais à dieta humana [69]. Por possuir qualidades excepcionais, o óleo de girassol tem despertado interesse recente para a produção de biodiesel [70], sendo inserido no Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel [71].

3.2.4 Pinhão-mansão

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma árvore pequena que pode ter de 5 - 7 m de altura. Originária da América do Sul, pertence à família *Euphorbiaceae* e contém cerca de 175 espécies conhecidas [72]. As sementes de pinhão-mansão contêm de 27 - 59% de óleo [73,74], cujos principais ácidos graxos são o linoleico, oleico, esteárico e palmítico, com composição de 22,5% de ácidos graxos saturados e 77,5% de ácidos graxos insaturados [72].

Trata-se de uma planta que se adapta a solos pobres e condições climáticas severas [75], podendo crescer em condições anuais de pluviosidade de até 1500 mm, e por isso é capaz de suportar longos períodos de seca [76], se desenvolver em regiões tropicais e subtropicais [77] e apresentar resistência às pragas [26]. Por ser uma espécie não comestível, não há competição entre os setores de produção de alimento e de combustível [75]. Esta espécie contém certa quantidade de ácidos graxos que são adequados para a produção de biodiesel [26], além de ser empregado na produção de sabões e biopesticidas [78].

3.3 Composição química elementar do biodiesel

A presença de metais (sejam estes micro-, macronutrientes ou essenciais) nos subprodutos (óleo vegetal e biodiesel) de plantas oleaginosas deve-se, principalmente, pela

absorção de nutrientes do solo [19] ou pela adubação química e/ou orgânica [79]. Além disso, os metais podem ser incorporados no processo de extração, purificação e armazenamento do óleo vegetal [44,80], ou até mesmo durante a produção e armazenamento do biodiesel [19]. Concentrações elevadas de constituintes inorgânicos no biodiesel podem causar problemas ambientais, danos no motor [80], acelerar a decomposição do biocombustível, catalisar reações de oxidação e reduzir a estabilidade térmica e a eficiência do biodiesel [81]. Os metais são os principais responsáveis pela degradação do biodiesel, uma vez que catalisam os processos de oxidação das cadeias de carbono, resultando na formação de ácidos orgânicos de cadeia curta, cetonas, aldeídos, hidrocarbonetos, amidos, polímeros e dímeros [82].

Metais alcalinos, como o sódio (Na) e potássio (K), podem ser incorporados ao biodiesel quando grandes quantidades de catalisador (p. ex. NaOH e KOH) são utilizados na reação de transesterificação do óleo vegetal. No entanto, grande parte de Na e K pode ser removido no processo de lavagem do biodiesel com água, sendo este processo o responsável pela adição de pequenas quantidades de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) ao produto final [83]. Cálcio e Mg também podem ser incorporados ao biodiesel durante o processo de secagem, uma vez que neste é usualmente utilizado $MgSO_4$ e CaO para remover a água residual [83-85]. A presença de metais como Na e K podem contribuir para o desgaste de peças do motor (injetor, bomba de combustível, pistão etc), uma vez que a presença destes elementos na forma de sólidos abrasivos ou sabões insolúveis [32] podem se depositar nos filtros dos veículos [25,80]. Por sua vez, os metais Ca e Mg aumentam a formação de sedimentos e sabões na câmara de combustão, o que leva a falhas de injeção e entupimento de algumas partes do motor [83]. Segundo a Resolução ANP 45/2014 [16], o teor máximo permitido para a soma de Ca+Mg é de $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$, assim como a soma de Na+K também é de $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$.

Outros elementos como o fósforo (P) e enxofre (S) também são determinados no biodiesel, sendo o primeiro proveniente dos fosfolipídios presente em matéria-prima como óleo vegetal e gordura animal, e o segundo proveniente dos ácidos sulfúricos e sulfônicos formados durante a oxidação do biocombustível [86]. Segundo a Resolução ANP 45/2014, o valor máximo permitido (VMP) para esses elementos é de 10 mg kg^{-1} [16]. Alguns elementos, mesmos que ausentes na Resolução ANP 45/2014, também são determinados, como por exemplo: Cu, Mn e Ni [Sarin *et al* (2009)] e Fe, Al e Zn [Dwivedi & Sharma (2015)] que podem influenciar na estabilidade oxidativa do biodiesel, ou Cr, V, Ni e Pb, Cd, As, Hg que podem ser liberados no ambiente durante a combustão do biodiesel, contribuindo para o aumento da poluição do ar e causando doenças respiratórias [18,87].

Neste sentido, monitorar a presença de metais é muito importante para garantir a qualidade do biodiesel, uma vez que quantidades acima da legislação vigente ou mesmos de outras espécies podem contribuir para o desgaste do motor, acelerar o processo de oxidação do biodiesel e influenciar no impacto ambiental durante a queima desse biocombustível [44].

3.4 Procedimentos de preparo de amostras para determinação de metais

Dentre as etapas que compõe uma sequencia analítica, aquela dedicada ao preparo de amostra tem influência direta nos resultados obtidos [88]. Para alcançar resultados satisfatórios, ou seja, boa precisão e exatidão, a escolha do método de preparo de amostra mais adequado deve envolver o conhecimento sobre as propriedades físico-químicas do(s) analito(s) de interesse, a complexidade da matriz da amostra e, quando possível, a faixa de concentração dos analitos nas amostras selecionadas [89]. Este conhecimento prévio permite direcionar as amostras para a técnica analítica de determinação mais apropriada.

Matrizes que contém elevado teor de matéria orgânica (p. ex. óleo vegetal e biocombustível) requerem, em grande parte, procedimentos de preparo de amostra eficientes e que permitem reduzir a quantidade de carbono da amostra utilizando ácidos concentrados e aquecimento [90-92]. No entanto, além da digestão ácida, é bastante comum que o preparo de amostra para matrizes oleosas seja feita por meio da diluição da amostra com solventes orgânicos [93], preparo de emulsões e/ou microemulsões estáveis [18,19,32,83], combustão [94,95] e extração [96,97].

3.4.1 Digestão ácida

O procedimento de digestão ácida é realizado com aquecimento da amostra e adição de um ácido mineral oxidante concentrado, de misturas de ácidos oxidantes ou mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio [90]. A maioria das amostras é oxidada completamente e os elementos de interesse são deixados na solução ácida na forma inorgânica [89]. Ácido nítrico, clorídrico, sulfúrico, fluorídrico e peróxido de hidrogênio, assim como a mistura desses reagentes são usados para digestão de amostras com elevado teor de matéria orgânica, ligas metálicas, minérios, solos, rochas, argilas e silicatos [98]. A principal vantagem desse método é que a solução obtida ao término do procedimento é compatível com várias técnicas analíticas utilizando a calibração com soluções aquosas. No entanto, o elevado tempo para a completa digestão, possíveis perda dos analitos de interesse por volatilização e

contaminação são algumas desvantagens ao utilizar esse procedimento em sistema aberto [99].

Korn *et al* (2010) [81] determinaram Ca, P, Mg, K e Na em amostras de biodiesel por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES), utilizando ácido nítrico, sulfúrico e peróxido de hidrogênio na digestão em sistema aberto em bloco digestor com aquecimento condutivo e a mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio para a digestão em micro-ondas. Segundo os autores, os resultados obtidos para a recuperação nos dois procedimentos foram estatisticamente concordantes. No entanto, o sistema de digestão em forno micro-ondas com cavidade foi escolhido por ser menos moroso, apresentar maior segurança e utilizar menores quantidades de reagentes.

Bakircioglu *et al* (2013) [100] propuseram a determinação dos elementos Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn em amostras de óleos de girassol, avelã, canola, milho e azeite de oliva por ICP OES, no qual empregaram a digestão úmida pela mistura de ácido nítrico:peróxido de hidrogênio [2:1 (v/v)]. Os resultados obtidos com a digestão úmida foram comparados aos da extração por ultrassom e extração induzida por quebra de emulsão, e segundo os autores o procedimento foi rápido, apresentou confiabilidade e simplicidade satisfatórias, além de recuperações de 96 a 109%.

Em estudo realizado por Aranda *et al* (2012) [18], foi realizada a determinação de Cd e Hg em biodiesel por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica, no qual foi utilizada a digestão em micro-ondas com uma mistura de ácido nítrico:peróxido de hidrogênio [7:1 (v/v)]. Os resultados obtidos para a digestão em micro-ondas foram utilizados para verificar a precisão do procedimento de preparo de amostra por meio de emulsão, e segundo os autores o preparo da amostra baseado na emulsão consumiu menos tempo e quando combinado com o ET AAS apresentou excelente sensibilidade.

3.4.2 Diluição com solventes orgânicos

Procedimentos de preparo de amostra envolvendo a diluição com solventes orgânicos é uma prática simples e rápida [99]. Este procedimento consiste na diluição das amostras oleosas em solventes como o xileno [101], pentano [102], hexano [103-104] ou querosene [105]. Segundo a ANP 45/2014 [16], a determinação de Na, K, Ca e Mg em biodiesel é feita por meio da diluição da amostra em xileno e análise por espectrometria de absorção atômica. Embora esse seja o método proposto pela legislação nacional, algumas desvantagens são observadas como a baixa estabilidade do analito no padrão e na amostra, o alto custo dos

padrões orgânicos em comparação com os padrões inorgânicos e o uso de solventes carcinogênicos [25].

Chaves *et al* (2011) [106] realizaram a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, S e Zn em biodiesel e óleos vegetais por ICP OES, sendo que as amostras foram diluídas em etanol e 1-propanol. Segundo os autores, utilizando o procedimento estabelecido foram obtidas recuperações de 87 a 116% (biodiesel) e 95 a 106% (óleo vegetal), boa precisão e limites de detecção na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$.

Já Barros *et al* (2012) [107] determinaram Na e K em biodiesel por F AES pela diluição em etanol. Segundo os autores, este procedimento foi simples, rápido e de baixo custo, além de ter apresentado precisão e exatidão satisfatórios com recuperações 91 - 108% e %RSD inferiores a 13%. A utilização do etanol como solvente orgânico na diluição de combustíveis permitiu reduzir os problemas apresentados para os outros solventes orgânicos, e por isso pode ser um solvente alternativo no preparo de amostras utilizando o procedimento de diluição com solventes.

3.4.3 Emulsão e Microemulsão

Entende-se por emulsão todo sistema heterogêneo formado por duas fases líquidas, dispersas uma em outra promovida por um processo mecânico [32]. Trata-se de um sistema de baixa estabilidade devido a pouca miscibilidade dos líquidos envolvidos, o que pode ser contornada com a adição de surfactantes apropriados [32,108]. Este sistema é formado pela agitação mecânica dos componentes resultando em sistemas com aspecto turvo-leitoso, e devido à baixa estabilidade, a separação das fases pode ocorrer rapidamente [99].

Em estudo realizado por Pereira *et al* (2013) [109], foram determinados Cu, Mn e Ni em biodiesel de soja por ET AAS, empregando a extração induzida por quebra de emulsão como preparo de amostra, cuja solução extratora era composta por Triton X-114 (surfactante) e ácido nítrico. A quebra da emulsão ocorria pela agitação das amostras em um agitador horizontal, seguida de aquecimento. Segundo os autores, esse procedimento foi simples, eficiente, e livre de interferências de matriz. As recuperações obtidas foram entre 89% e 109% com limites de detecção de $0,18 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu), $0,60 \mu\text{g L}^{-1}$ (Mn) e $0,99 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ni).

Já Pereira *et al* (2014) [83] determinaram Ca e Mg em biodiesel de soja por FS-FAAS, empregando o mesmo procedimento de preparo de amostra descrito acima. Segundo os autores, recuperações entre 88% - 106% e excelentes limites de quantificação ($0,047$ e $0,013 \text{ mg L}^{-1}$ para Ca e Mg, respectivamente) foram obtidos, além de ter sido simples e rápido.

Em contrapartida, microemulsões são sistemas homogêneos formados espontaneamente por agitação mecânica promovida pela mistura de dois líquidos imiscíveis na presença de um terceiro componente, que pode ser um surfactante ou um co-surfactante [32]. É um sistema mecânico e termicamente estável, transparente ou translúcido e com baixa viscosidade [19].

Os sistemas de microemulsão apresentam algumas vantagens quando comparada a digestão ácida, a diluição com solvente ou até mesmo com a emulsão, como a possibilidade do uso de padrões inorgânicos para o preparo das soluções de calibração, o que permite evitar o uso de solventes orgânicos tóxicos [20], reduz o tempo no preparo de amostra, utiliza pequena adição de ácidos concentrados e reduz a perda dos analitos por volatilização [99].

De Jesus *et al* (2008) [25] prepararam microemulsões formadas por 57,6% (m/m) de *n*-pentanol, 20% (m/m) de biodiesel, 14,4% (m/m) de Triton X-100 e 8% (m/m) de água, para determinar Na e K em biodiesel de soja, girassol, mamona e proveniente de gordura animal por F AAS. Segundo os autores, o procedimento foi simples, rápido e eficiente, apresentando limites de detecção de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (Na) e $0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ (K) e recuperações de 95% - 115% (biodiesel) e 90% - 115% (óleos vegetais) quando foram utilizados padrões inorgânicos na calibração.

Já Silva *et al* (2010) [110] determinaram Cd, Pb e Tl em biodiesel por GF AAS, no qual prepararam microemulsões compostas por $\approx 2,0$ g de biodiesel, 1,0 mL de 10% (v/v) HNO_3 e *n*-propanol até completar 10 mL. Este procedimento apresentado foi aplicado em amostras de biodiesel, e segundo os autores o método apresentou recuperações entre 80 e 116%, RSD inferior a 8,0% e limites de detecção de 0,5; 6,0 e $1,0 \text{ ng g}^{-1}$, para Cd, Pb e Tl, respectivamente.

Lyra *et al* (2010) [19] propuseram a determinação de Na, K, Ca e Mg em biodiesel por F AAS pelo preparo de microemulsões compostas de 10% (m/v) de biodiesel, 75% (v/v) *n*-propanol, 1,0% (v/v) de ácido nítrico e 14% (v/v) de solução aquosa formada por 0,2% (v/v) de ácido nítrico e 0,5% (v/v) de supressor de ionização. Segundo os autores, a formação das microemulsões foi simples e rápida, onde não houve influência da matriz. Com este procedimento, limites de detecção de 0,1; 0,01; 0,04 e $0,004 \mu\text{g g}^{-1}$ para Na, K, Ca e Mg, respectivamente, foram alcançados. Os resultados obtidos foram comparados com procedimento envolvendo a diluição de biodiesel em xileno de acordo com a norma ABNT NBR 15556 e de acordo com Lyra *et al* os resultados foram concordantes ao nível de 95% de confiança. Testes de adição e recuperação foram efetuados e segundo os autores estes se situaram na faixa de 89% a 103%.

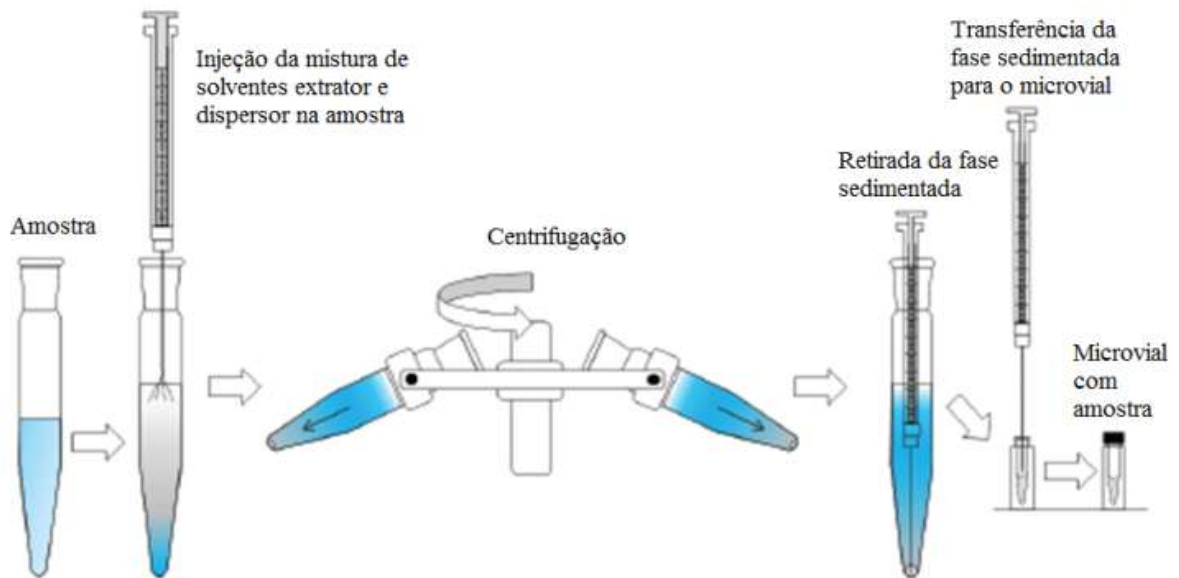
Em estudo realizado por Amais *et al* (2012) [20], os teores de Ca, Mg e Zn foram determinados em amostras de biodiesel por F AAS utilizando o preparo de soluções em microemulsões compostas de biodiesel, Triton X-100, 20% (v/v) HNO₃ e n-propanol [10:5:5:80 (v/v)]. Segundo os autores, esse procedimento foi simples, rápido e eficiente na análise da matriz complexa, obtendo recuperações de 76,5% a 116,2%.

3.4.4 Microextração líquido-líquido dispersiva

Outros procedimentos, como aqueles que adotam a análise direta da amostra utilizando a mínima manipulação possível, também têm sido reportados na literatura [111]. A propósito, estabelecer procedimentos de preparo de amostra de modo que não haja a decomposição da mesma, como já descrito, tem despertado interesse da comunidade científica e vem sendo inicialmente avaliados [18,100]. Dentro deste contexto, a microextração líquido-líquido dispersiva é um procedimento de preparo de amostra recente e que tem sido proposto para a extração dos analitos e/ou espécies de interesse em diversas matrizes.

A Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) foi proposta em 2006 por Rezaee e colaboradores [88,112,113] e trata-se de um sistema ternário de solventes formado pela amostra aquosa, por um solvente extrator e um solvente dispersor [88]. Nesse procedimento de extração, uma mistura do solvente extrator e do solvente dispersor, que é miscível na fase aquosa (amostra) e na fase orgânica (solvente extrator) é rapidamente injetada na amostra, resultando na formação de uma solução turva. O solvente extrator, que está disperso na solução na forma de microgotas, é sedimentado com os analitos no fundo do tubo por meio de centrifugação (Figura 2). Essa fase sedimentada é então analisada por técnicas analíticas convencionais [88,114-116].

Figura 2. Diagrama representativo que demonstra as etapas básicas de um procedimento utilizando a DLLME.



Fonte: Martins *et al* (2012) [88].

Os principais fatores que afetam a eficiência da extração por DLLME são: tipo de solvente extrator e dispersor, volume de solvente extrator e dispersor, pH da amostra, força iônica do meio, tempo de extração e tempo e velocidade de centrifugação [112].

O solvente extrator selecionado deve apresentar maior densidade do que a água e ser capaz de extrair as espécies de interesse para o menor e suficiente volume possível com vistas a obter alto fator de enriquecimento [113]. Os solventes clorados como o clorobenzeno [117-119], o tetracloreto de carbono [120-122] e o tetracloroetileno [123-126] são utilizados com frequência como solventes extratores [127]. O solvente dispersor deve ser miscível tanto na fase aquosa, quanto no solvente extrator (apolar) e promover a formação de microgotas do solvente extrator dispersas na fase aquosa, e ainda ser capaz de diminuir a tensão superficial entre ambas as fases [88,114]. O volume do solvente dispersor afeta a formação da solução turva, o grau de dispersão do solvente extrator e, conseqüentemente, a eficiência da extração [114]. Os solventes dispersores mais utilizados são: acetona [116,124,128], metanol [129-131], acetonitrila [132-134], tetra-hidrofurano [135] e etanol [136,137].

O pH afeta a eficiência da extração e a seletividade da DLLME [138], e por isso é necessário manter os analitos orgânicos na forma não ionizada para elevar a tendência destes serem extraídos pelo solvente extrator [112], ou seja, o pH deve ser avaliado em função da acidez ou basicidade de algumas substâncias e/ou espécies [88]. A influência da força iônica

também deve ser considerada, pois esta afeta na separação das fases [139]. Ao aumentar a concentração de NaCl, há um aumento no volume da fase sedimentada, pois ocorre a diminuição da solubilidade do solvente extrator na presença do sal adicionado [113].

O tempo de extração em procedimentos envolvendo a DLLME é definido como o tempo entre a injeção da mistura do solvente extrator e dispersor e a centrifugação. A literatura tem mostrado que o equilíbrio é alcançado rapidamente e a extração é realizada após a formação da solução turva [140]. Já a centrifugação é essencial para que se obtenham duas fases claramente separadas nos tubos de extração, e após a retirada da fase sedimentada, esta pode ser injetada diretamente no equipamento ou evaporada e redissolvida em um solvente apropriado [113].

A DLLME, quando comparada a outros procedimentos de extração, apresenta algumas vantagens, como: simplicidade na operação, rapidez, baixo custo, elevada recuperação, alto fator de enriquecimento e menor consumo de solventes orgânicos [115,116,127,132,141], além do potencial para aplicação direta em campo [88]. No entanto, apresenta também algumas desvantagens, como a falta de automação, a pequena fase extratora recuperada [142] e o tempo elevado de centrifugação necessário para completa separação das fases envolvidas [112].

A DLLME tem sido amplamente utilizada na extração e pré-concentração de substâncias orgânicas como pesticidas [143-145], produtos farmacêuticos [146-148], aminas [149-151] e fenóis [152-154] em amostras aquosas, alimentícias e biológicas [88]. No entanto, desde 2007 este procedimento de preparo de amostra tem sido avaliado, principalmente, na extração de espécies inorgânicas em matrizes aquosas. A Tabela 2 apresenta alguns trabalhos relacionados com a determinação de metais em diferentes matrizes utilizando a DLLME como procedimento de preparo de amostra.

Tabela 2. Aplicações do procedimento de DLLME para determinação de espécies inorgânicas em diferentes matrizes.

Analito	Matriz	Solvente Extrator	Solvente Dispensor	Técnica Analítica	Recuperação	Fator de enriquecimento	Referência
Cu ²⁺	Água e serum	[C ₄ mim][PF ₆] ^a e TX-100 ^b	-	F AAS	-	70	[155]
Pd ²⁺	Água, solo e alimento	Clorofórmio	Acetona	F AAS	-	20,7	[116]
AuNPs	Água	1,2-dicloroetano e TX-114 ^c	-	ETV-ICP-MS	89,6-102%	152	[156]
Cd ²⁺	Fluidos do corpo humano	TOMATS ^d	-	ETAAS	95-103%	10,4	[157]
Cd ²⁺ e Pb ²⁺	Mel	CCl ₄	Acetonitrila (Cd) Acetona (Pb)	F AAS	61-111% (Cd) 99-115% (Pb)	-	[132]
Cd ²⁺ e Pb ²⁺	Óleos vegetais	Álcool isopropílico e solução HNO ₃	-	ETAAS	98% (Cd) 101% (Pb)	140	[96]
Tl ³⁺	Água	Undecanol	Acetona	F AAS	97,0%	17	[128]
Zn ²⁺ e Cd ²⁺	Água	CCl ₄	Etanol	F AAS	98,5-102%	10,3 (Zn) 13,4 (Cd)	[158]
Co ²⁺	Alimento/amostras ambientais/água	Clorofórmio	Etanol	F AAS	97,7-103,8%	8	[127]
Hg ²⁺	Urina	[Hmim][NTf ₂] ^e	-	SWASV	97-100%	-	[159]
AgNPs	Água	[Omim][PF ₆] ^f	Metanol	ICP-MS	71,0-90,9%	>90	[129]
As ³⁺ e As ⁵⁺	Água	Undecanol	Acetona	GFAAS	94,1-110,0%	1520	[160]

Analito	Matriz	Solvente Extrator	Solvente Dispersor	Técnica Analítica	Recuperação	Fator de enriquecimento	Referência
Pb ²⁺ / Co ²⁺ / Cu ²⁺ / Ni ²⁺ / Zn ²⁺	Água residual	1-undecanol	Etanol	ICP-MS	95,92-107,65	240-270	[136]
Ag ⁺	Água	Clorofórmio	Etanol	F AAS	95-102	65	[137]
Cu ²⁺	Água mineral	[C ₆ mim][PF ₆] ^g	Gás argônio	UV-Vis	94-103	122	[141]
Cu ²⁺	Água de torneira, rio e mar	1-undecanol	-	F AAS	94-112	20	[161]
Cr ³⁺ e Cr ⁶⁺	Sangue humano	[C ₈ mim][PF ₆] ^h	Acetona	ET AAS	95-101 (Cr ³⁺) 96-102 (Cr ⁶⁺)	25,2	[162]
Cd ²⁺ e Pb ²⁺	Refrigerante	Tetracloroeto de carbono	Acetona (Cd) Acetonitrila (Pb)	GF AAS	91-113 (Cd ²⁺) 95-108 (Pb ²⁺)	-	[133]
Cr ³⁺ e Cr ⁶⁺	Água	Tetracloroeto de carbono	Acetonitrila	UV-Vis	99,5-104,3	15,87	[134]
Cd ²⁺	Água e sedimentos	Tetracloroeto de carbono	Metanol	F AAS	90-110	-	[163]
Cd ²⁺	Urina e sangue	TOMATS	Acetona	ET AAS	97,4 (urina) 95 (sangue)	10,4	[157]
As ³⁺ e As ⁵⁺	Sucos de fruta	Tetracloroeto de carbono	Metanol	HG-AFS	92-102	-	[131]
Se ⁴⁺ e Se ⁶⁺	Alimentos e bebidas	[C ₆ mim][NTf ₂] ⁱ	-	ET AAS	97-101	150	[164]
Pd ²⁺	Água e poeira	1-dodecanol	Tetraidrofurano	F AAS	96-104	93	[135]
As ³⁺ / Se ⁴⁺ / Te ⁴⁺	Água	Bromobenzeno	Metanol	ETV-ICP-MS	86,3-107	-	[165]
Hg ²⁺	Água	[Hmim][NTf ₂] ^j	-	SPCnAuEs	95-108	-	[166]

^g hexafluorofosfato 1-hexil-3-metilimidazólio; ^h hexafluorofosfato 1-octil-3-metilimidazólio; ⁱ bis [(trifluorometil)sulfonil]imida 1-hexil-3-metilimidazólio; ^j bis[(trifluorometil)sulfonil]imida 1-hexil-3-metilimidazólio

Analito	Matriz	Solvente Extrator	Solvente Dispersor	Técnica Analítica	Recuperação	Fator de enriquecimento	Referência
Fe ²⁺	Água e alimento	Tetracloroeto de carbono	Etanol	UV-Vis	95,4-103,2 (alimento) 96,9-103,6 (água)	-	[167]
Cu ²⁺ e Fe ²⁺	Vinho branco e tinto	1,2 diclorobenzeno	Metanol	F AAS	91-110 (Cu) 89-113 (Fe)	-	[130]
Bi ³⁺	Água	Tetracloroeto de carbono	Metanol	UV-Vis	96,3-103,6	-	[168]
Cr ⁺ / Cu ⁺ / Mn ²⁺ / Ni ⁺ / Zn ²⁺	Água	Tetracloroeto de carbono	-	LIBS	107 (Cu) 93 (Mn) 109 (Ni)	4,8 (Cr) 4,0 (Cu) 5,5 (Mn) 4,7 (Ni) 5,5 (Zn)	[169]
Au ³⁺ e Pd ²⁺	Conversor catalítico / minério / sedimento rodoviário	Clorofórmio	Acetona	F AAS	94-98 (Au) 96-97 (Pd)	94 (Au) 113 (Pd)	[170]
Cu ²⁺	Cereal e alimento vegetal	Clorofórmio	Etanol	F AAS	93,5-98,0	55	[171]

Algumas modificações têm sido propostas para elevar a eficiência e aumentar a aplicação deste procedimento de preparo de amostra, como: DLLME utilizando líquidos iônicos (IL-DLLME) [141,166,172], DLLME utilizando solventes de baixa toxicidade (LT-DLLME) [173], DLLME com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFO) [115,128,136], DLLME com solventes de baixa densidade e quebra de emulsão com solvente (LDS-SD-DLLME) [174], microextração líquido-líquido assistida por ar (AALLME) [175-177], DLLME utilizando tensoativos (AS-DLLME) [156], DLLME assistida por ultrassom (UA-DLLME) [163], DLLME assistida por *vórtex* (VALLME) [178,179], DLLME assistida por micro-ondas (MA-DLLME) [147,151] e DLLME assistida por agitação manual [180].

Na extração de espécies inorgânicas, os analitos são frequentemente complexados com agentes quelantes [88], e desta maneira é possível transferir os analitos para o solvente extrator, que é um solvente orgânico (apolar). Neste procedimento o solvente dispersor tem o papel de interagir tanto com a fase aquosa quanto com a fase orgânica, ou seja, o solvente dispersor é miscível na fase aquosa e na fase orgânica. A aplicação da DLLME na extração de metais está sendo amplamente utilizada em matrizes aquosas, e por isso os estudos relacionados com a extração de espécies inorgânicas em matrizes complexas (p.ex. óleo vegetal, diesel e biodiesel) ainda são bastante incipientes. Entretanto, quando a amostra é uma matriz complexa, ou seja, uma matriz orgânica, a extração dos analitos utilizando uma fase orgânica como solução extratora não é satisfatória. Nestes casos, o procedimento baseado na microextração líquido-líquido dispersiva reversa (R-DLLME) tem sido empregado. Este procedimento utiliza um solvente extrator, que normalmente é uma solução ácida diluída, e um solvente dispersor, que normalmente é um álcool de cadeia curta. Quando a R-DLLME é utilizada em matrizes complexas, os analitos presentes na matriz orgânica são lixiviados/transferidos da fase orgânica para a fase aquosa. Além disso, somente na R-DLLME se utiliza temperatura controlada, agitação em *vórtex* e banho de ultrassom.

López-García *et al* (2014) [96] aplicaram a microextração líquido-líquido dispersiva reversa (R-DLLME) para a determinação de Cd e Pb em óleos vegetais por ET AAS, utilizando 300 µL de uma solução de álcool isopropílico:3,0% (v/v) HNO₃ [4:1 (v/v)] como solvente dispersor e extrator, respectivamente.

De forma semelhante, López-García *et al* (2015) [97] determinaram compostos de arsênio (arsênio inorgânico, metilarsonato, dimetilarsonato e arsenobetaína) em óleos comestíveis por ET AAS, em que empregaram a R-DLLME seguindo o mesmo procedimento descrito acima e, segundo os autores, obtiveram recuperações de 93 a 98% e limite de detecção de 0,03 ng g⁻¹.

3.5 Técnicas espectroanalíticas aplicadas à determinação de metais e metaloides em biodiesel

As determinações de metais e metaloides em amostras de biodiesel têm sido realizadas por técnicas espectroanalíticas, como a espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) [19,25,83], a espectrometria de emissão atômica em chama (F AES) [107], a espectrometria de absorção com atomização eletrotérmica (ET AAS) [18,109], a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) [81,100], a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [181] e a espectrofotometria molecular operante na região do ultravioleta e visível [84].

Cassela *et al* (2011) [182] determinaram Zn em óleo diesel por meio do preparo de emulsões formadas por 2,0 mL de 5% (m/v) Triton X-114 e 15% (v/v) HNO₃, seguido pela quebra das emulsões pelo aquecimento a 80 °C. Segundo os autores, três fases bem definidas foram formadas e a fase aquosa foi utilizada para determinação de Zn por F AAS. As condições experimentais foram otimizadas por meio da Matriz de *Doehlert* e foi possível a utilização da calibração externa com soluções padrão aquosas obtendo recuperações de 92 – 109% e excelentes limites de detecção (1,2 µg L⁻¹) e de quantificação (4,0 µg L⁻¹).

Ferreira *et al* (2015) [80] propuseram a determinação de Na, K e Ca em biodiesel por F AES, utilizando uma simulação de matriz através do preparo das soluções padrão e amostras em meio de oleato de metila e Li (1000 µg g⁻¹). Esse método de análise direta foi validado e, segundo os autores, apresentou limites de quantificação 0,09, 0,07 e 0,43 µg kg⁻¹ para Na, K e Ca, respectivamente.

Aucélio *et al* (2004) [183] realizaram a determinação de vanádio em diesel e asfalto por ET AAS utilizando o preparo das microemulsões com 1-propanol e HNO₃. De acordo com os autores, limites de detecção de 5,0 µg L⁻¹ e 4,0 µg g⁻¹, para diesel e asfalto, respectivamente, foram obtidos com recuperações de 113% (diesel) e 105% (asfalto).

Quadros *et al* (2011) [184] propuseram a determinação de Al, Cu, Fe e Mn em biodiesel por meio da espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução com atomização eletrotérmica (HR-CS ET AAS), cujo preparo das amostras consistiu na diluição das amostras de biodiesel em etanol. Segundo os autores, o procedimento apresentou simplicidade, precisão e exatidão satisfatórias, com recuperações de 90 - 105% (Al); 95 - 105% (Cu); 99 - 106% (Fe) e 96 - 108% (Mn). Os limites de quantificação foram 0,009 µg g⁻¹ (Cu), 0,006 µg kg⁻¹ (Fe), 0,003 µg kg⁻¹ (Mn) e 0,013 µg kg⁻¹ (Al).

Lobo *et al* (2011) [30] realizaram a determinação de Ni e Cd em biodiesel por espectrometria de absorção atômica em forno grafite (GF AAS), por meio do preparo de microemulsões compostas por 0,5 g de biodiesel, 5,0 g de Triton X-100 e 1% (v/v) de HNO₃. Segundo os autores, este procedimento de preparo de amostra foi simples e rápido, com limites de detecção $\leq 0,9$ e $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, para Ni e Cd, desvio padrão relativo (RSD) inferior a 8,20% e recuperações 93 - 108% (Ni) e 98 - 116% (Cd).

Por meio da comparação de métodos univariados e multivariados na otimização das condições experimentais, Lobo *et al* (2009) [185] propuseram a determinação de Cu, Pb, Ni e Cd em biodiesel por GF AAS empregando a microemulsão e a digestão ácida em sistema focalizado. Os autores concluíram que a análise multivariada foi uma ferramenta útil para estabelecer as temperaturas ótimas de pirólise e atomização, o melhor procedimento de preparo de amostra e o tipo de modificador químico.

Em trabalho realizado por Reyes & Campos (2005) [186] foi realizada a determinação de Ni e Pb em amostras de diesel e gasolina por GF AAS pelo preparo de microemulsões formadas por 1-propanol e HNO₃. Microemulsões em n-hexano foram usadas para calibração e, segundo os autores, foram obtidos limites de detecção para gasolina e diesel de $4,5$ e $3,6 \mu\text{g L}^{-1}$, Ni e Cd, respectivamente. A utilização de Pb + Mg como modificador convencional e Ir como modificador permanente mostrou bom desempenho para Pb.

Sant'Ana *et al* (2007) [187] propuseram a determinação de Al, Cu, Fe, Ni e Zn em óleo diesel por ICP OES, em que o preparo de amostra consistiu na digestão em micro-ondas. Segundo os autores, $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ Y (ítrio) foi utilizado como padrão interno para determinação dos analitos, o procedimento de digestão foi eficiente e as recuperações para Al, Cu, Fe e Ni foram superiores a 90%.

Em estudo realizado por Orosco *et al* (2014) [188] o teor de Na, K, Ca, Mg, Pb e de 20 metais pesados foi determinado em biodiesel obtido à partir de sementes de girassol, milho, soja e uva por ICP OES sem prévio tratamento das amostras. Segundo os autores, o procedimento foi simples e rápido, no qual se obteve recuperações no intervalo de 95 a 106% e RSD inferiores a 10%.

Nomngongo *et al* (2014) [189] determinaram Ag, Al, As, Mn e Ti em amostras de diesel e gasolina por ICP OES utilizando a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para extração dos analitos. A técnica multivariada foi utilizada na otimização das condições experimentais e sob as condições otimizadas foram obtidos fatores de pré-concentração de 150, 291, 112, 405 e 367, para Ag, Al, As, Mn e Ni, respectivamente.

Segundo os autores, o procedimento apresentou exatidão e precisão satisfatórias com recuperações de 96 - 101% e RSD inferiores a 5,0%.

Shishov *et al* (2014) [84] realizaram a determinação de Ca e Mg em biodiesel por espectrofotometria por meio da formação de complexos de Ca (II) e Mg (II) com negro de eriocromo T (EBT). As amostras de biodiesel foram submetidas à diluição *on-line* em álcool isopropílico seguido da injeção em etapas por um procedimento de fácil realização. Os limites de detecção foram $0,6 \mu\text{g g}^{-1}$ (Ca) e $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ (Mg) e, segundo os autores, o método foi rápido, utilizou pequenas quantidades de amostras e apresentou baixo custo.

3.6 Análise estatística multivariada

Em muitas metodologias analíticas é comum utilizar a otimização dos parâmetros instrumentais e/ou experimentais de forma univariada para estabelecer as melhores condições para a determinação das espécies de interesse [163]. No entanto, esta tarefa pode ser morosa e utilizar grandes quantidades de reagentes [190], além de não considerar as interações entre as variáveis envolvidas no experimento [163].

Para contornar estes inconvenientes, a utilização de métodos quimiométricos no desenvolvimento de procedimentos analíticos vem sendo continuamente aplicado porque reduz o número de experimentos, são bastante eficazes e permite que as variáveis sejam otimizadas simultaneamente [163,191]. Para extrair o máximo de informação quando a análise estatística multivariada é utilizada, é recomendado traçar um planejamento experimental prévio que envolva todas as variáveis independentes que influenciam diretamente na determinação dos analitos de interesse [192]. Na execução da análise multivariada, planejamentos fatoriais completos ou fracionados são bastante utilizados porque além dos benefícios descritos acima, também minimizam o uso de reagentes e resíduos gerados, reduz tempo e elimina algumas variáveis pouco significativas no experimento [192]. Exemplo clássico deste procedimento consiste em um experimento com dois fatores (A e B) e que são testados com a níveis para o fator A e b níveis para o fator B. Um experimento fatorial com k fatores, sendo cada um deles com dois níveis, é denominado experimento fatorial 2^k . Em um experimento com três fatores (x_1 , x_2 e x_3) e dois níveis (+1, -1), se tem um experimento fatorial 2^3 , em que esses níveis são codificados e envolvem o valor mínimo (-1) e o máximo (+1) [193]. Com esse tipo de planejamento é possível determinar os efeitos que as variáveis independentes e as interações entre elas produzem na resposta analítica [193].

Habila *et al* (2016) [191] realizaram a determinação de Pb em amostras de água por FAAS empregando a DLLME combinada com a otimização multivariada. Os parâmetros pH, volume de solvente extrator e dispersor e volume de ligante foram otimizados e as porcentagens de recuperação foram selecionadas como respostas analíticas pelo planejamento *Plackett-Burman*. Também foram obtidos gráficos de superfícies de resposta em 3D para cada par de variáveis, pH-volume de extrator, pH-volume de ligante e volume de ligante-volume de extrator. Segundo os autores, o método foi simples, rápido e eficiente, no qual se obtiveram RSD inferiores a 5,3%, recuperações de 94 - 104%, fator de pré-concentração de 50 vezes e limites de detecção e quantificação de $4,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $14,2 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

No estudo realizado por Meira & Dias (2017) [163] o teor de Cd foi determinado em amostras de sedimentos e de água por F AAS utilizando a DLLME para extração e pré-concentração do analito. Para a otimização da mistura formada pelo solvente extrator, dispersor e agente complexante o planejamento foi utilizado, e as variáveis pH, concentração de NaCl e tempo de sonicação foram otimizados pela matriz de *Doehlert*. Segundo os autores, a análise multivariada permitiu uma otimização rápida e eficiente, além do método ter apresentado precisão e exatidão, com recuperações de 90 a 110%, fator de pré-concentração de 14 vezes, limites de detecção e quantificação de $0,23 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,76 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Grijalba *et al* (2017) [194] realizaram a especiação de Se em vegetais comestíveis dos gêneros *Allium* e *Brassica* por ET AAS utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico assistida por *vórtex* no preparo de amostra. Foi utilizado o planejamento fatorial fracionado para otimização dos seguintes parâmetros: volume de amostra, volume da mistura clorofórmio + líquido iônico, pH, força iônica, tipo de extração (*vórtex* ou ultrassom) e concentração de APDC. Foram obtidas superfícies de resposta 3D dos pares volume de amostra-tempo de extração, pH-[APDC], tempo de extração-[APDC] e pH-[APDC]. Segundo os autores, utilizando o método proposto obteve-se fator de pré-concentração de 100 vezes, recuperações de 94 a 100% para Se(IV) e 96,6 a 102% para Se(VI) e limite de detecção de $5,0 \text{ ng L}^{-1}$. A IL-VA-LLME apresentou alta sensibilidade com a pré-concentração.

Niazi *et al* (2015) [195] utilizaram métodos quimiométricos para a determinação de urânio (U) em amostras de água por espectrofotometria molecular empregando a microextração líquido-líquido dispersiva assistida por micro-ondas. O planejamento fatorial completo 2^4 foi empregado para otimização do pH, concentração de ligante, quantidade de solvente extrator e dispersor. A influência de cada variável e suas interações no sistema foram avaliadas pelo diagrama de Pareto. Segundo os autores, a análise multivariada permitiu uma otimização rápida, econômica e eficiente e a MA-DLLME apresentou alta eficiência e baixo

consumo de solvente orgânico, com fator de enriquecimento de 135 vezes e limite de detecção de $6,7 \text{ ng mL}^{-1}$.

Asadollahzadeh *et al* (2014) [196] realizaram a especiação de As (III e V) em amostras de água por ET AAS aplicando a microextração líquido-líquido dispersiva baseado na solidificação da gota orgânica flutuante. O planejamento fatorial fracionado 2^{6-1} foi utilizado para otimização do volume de solvente extrator e dispersor, concentração de ligante, pH, tempo de extração e concentração do sal. O diagrama de Pareto e os gráficos de superfície de resposta em 3D para os pares volume do solvente dispersor/volume do solvente extrator, concentração de ligante/volume solvente extrator, pH/volume do solvente extrator, concentração do ligante/volume do solvente dispersor, pH/volume do solvente dispersor e pH/concentração de ligante foram obtidos. Segundo os autores, a DSLME-ET AAS forneceu recuperações de 97,1 a 101,1% As(III) e 96,1 a 99,7% As(V), fator de enriquecimento de 135 vezes e limite de detecção $0,02 \text{ ng mL}^{-1}$.

Em trabalho realizado por Shah *et al* (2012) [197] o teor de Pb foi determinado em amostras de sangue por F AAS empregando a microextração em fase líquida dispersiva com líquido iônico em temperatura controlada. O planejamento fatorial completo 2^5 foi utilizado para otimização das seguintes variáveis: volume de líquido iônico, % de agente complexante, pH, tempo de incubação e temperatura. Segundo os autores, o diagrama de Pareto mostrou que as influências causadas pelas variáveis independentes líquido iônico, temperatura e pH foram as mais significativas e sendo então sistematicamente avaliadas pela matriz de *Doehlert* para obter as superfícies de resposta com pH vs % de líquido iônico e temperatura vs % de líquido iônico. Por meio do planejamento fatorial foi possível otimizar o procedimento baseado na TIL-DLME utilizando um menor número de experimentos. O procedimento proposto por Shah *et al* obteve fator de pré-concentração de 93 vezes e limite de detecção de $0,13 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentação e acessórios

As sementes oleaginosas foram secas em estufa SL-100 (*Solab*[®], Piracicaba, SP, Brasil), processadas em moinho multiuso TE-631/2 (*Tecnal*[®], Piracicaba, SP, Brasil) e pesadas em balança analítica M214Ai (*Bel Engineering*[®], Piracicaba, SP, Brasil). A extração dos óleos vegetais foi realizada em sistema *soxhlet* e o solvente evaporado com auxílio do evaporador rotativo MA-120 (*Marconi*[®], Piracicaba, SP, Brasil). Para o processo de degomagem e de reação de transesterificação foram utilizados agitador magnético TE-0851 (*Tecnal*[®], Piracicaba, SP, Brasil) e centrífuga Excelsa II 206 BL (*Fanem*[®], São Paulo, SP, Brasil).

Para a caracterização do biodiesel produzido, foi utilizado um viscosímetro capilar de vidro (*Láctea*[®], São Paulo, SP, Brasil) de acordo com as normas ASTM D445 – NBR 10441 e a cromatografia em camada delgada em placas cromatográficas (*Macherey-Nagel*[®], Düren, Alemanha).

Para o preparo das soluções foram utilizadas micropipetas (*Kasvi*[®], Curitiba, PR, Brasil) de 10 – 100 µL e 100 – 1000 µL.

No preparo da microextração líquido-líquido dispersiva reversa (R-DLLME) foi utilizado um Banho Maria (*Nova Técnica*[®], Piracicaba, SP, Brasil), um agitador tipo *vórtex* (*Biomixer*[®], Taboão da Serra, SP, Brasil), um banho ultrassom (*Max Labor*[®], Presidente Prudente, SP, Brasil) e a centrífuga Excelsa II 206 BL.

Para as medidas experimentais, foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica em chama AA 240FS (*Agilent Technologies*[®], Santa Clara, CA, USA) equipado com lâmpada de cátodo oco monoelementar (*Agilent Technologies*[®], Santa Clara, CA, USA) (Figura 3). Para a determinação de Ca, Na e K o equipamento foi ajustado no modo emissão atômica e para a determinação de Mg, no modo de absorção atômica, operando nas condições instrumentais de maior sensibilidade (Tabela 3).

Figura 3. Foto ilustrativa do espectrômetro de absorção atômica em chama AA 240FS.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 3. Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de Ca, Mg, Na e K em biodieisesis por espectrometria atômica.

Parâmetros Instrumentais	Ca	Mg	K	Na
Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	0,5 – 2,0	0,01 – 0,5	0,05 – 2,0	0,05 – 2,0
Linha atômica (nm)	422,7	285,2	766,5	589,0
Corrente da lâmpada (mA)	-	4,0	-	-
Fenda de saída (nm)	0,5	1,0	1,0	1,0
Composição da chama	N ₂ O/C ₂ H ₂	ar/C ₂ H ₂	ar/C ₂ H ₂	ar/C ₂ H ₂
Vazão de acetileno (L min ⁻¹)	6,35	2,0	2,0	2,0
Vazão de oxidante (L min ⁻¹)	11,00	13,5	13,5	13,5
Queimador (mm)	50	100	100	100
Taxa de aspiração (mL min ⁻¹)	5,0	5,0	5,0	5,0
Modo de Leitura	Emissão	Absorção	Emissão	Emissão

4.2 Reagentes e soluções analíticas

Água ultrapura (condutividade < 0,05 µS/cm) obtida a partir de um sistema de Osmose Reversa OS10LXE (*Gehaka*[®], São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada para o preparo de todas as soluções. A extração do óleo foi realizada em meio de hexano [95% (m/v), Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil].

Para o processo de degomagem dos óleos vegetais brutos obtidos, foi utilizado H_3PO_4 [85% (m/v) Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil]. Na reação de transesterificação foram utilizados CH_3OH [99,8% (m/v), Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil], KOH [85% (m/m), Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil], enquanto que no processo de lavagem e secagem do biodiesel foram utilizados NaCl [99,5% (m/m), Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil] e Na_2SO_4 [99% (m/m), Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil], respectivamente.

Na análise do índice de acidez foi utilizado KOH [85% (m/m), Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil] e $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ [99,5% (m/m), Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil].

Para o procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva reversa foi utilizado álcool isopropílico [99,5% (m/v), Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil] e HNO_3 [65% (m/v), Sigma-Aldrich[®], São Paulo, SP, Brasil].

Soluções padrão estoque monoelementares de 1000 mg L^{-1} (*SpecSol*[®], SRM-682, EUA) foram utilizadas para o preparo de soluções intermediárias monoelementares de Ca, Mg, Na e K nas concentrações de 25, 50 e 100 mg L^{-1} . As soluções intermediárias foram armazenadas em frasco de polipropileno (*Nalgene*[®], Rochester, NY, EUA) e utilizadas no preparo de soluções analíticas de calibração.

As soluções analíticas de calibração foram preparadas diariamente por meio de diluição apropriada das soluções intermediárias nos intervalos $0,5 - 2,0 \text{ mg L}^{-1}$ Ca, $0,01 - 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ Mg, $0,05 - 2,0 \text{ mg L}^{-1}$ K e Na em meio de 1,0% (v/v) de HNO_3 . Os brancos das soluções analíticas eram preparados com água ultrapura em meio de 1,0% (v/v) de HNO_3 .

O padrão organometálico (*Conostan*[®], Quebec, Quebec, Canadá) contendo 20 mg L^{-1} Na-P-K-Ca-Mg em biodiesel B100 foi utilizado para estabelecer as condições experimentais de extração dos analitos e como material de referência para verificar a precisão e exatidão do método de preparo de amostra proposto.

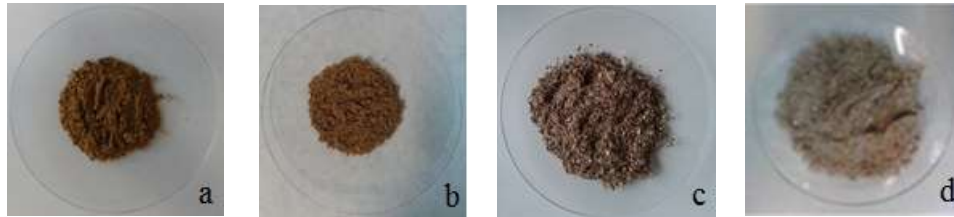
Todos os materiais utilizados foram descontaminados por imersão em solução 10% (v/v) HNO_3 por 24 horas e enxaguados com água destilada e deionizada.

4.3 Amostragem e preparo das amostras

As sementes das espécies oleaginosas canola (*Brassica napus* L.), crambe (*Crambe Hochst abyssinica*), girassol (*Helianthus annuus*) e pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) foram fornecidas pela Embrapa Agropecuária Oeste - Dourados/MS. As amostras foram lavadas abundantemente com água corrente e posteriormente com água destilada, para a remoção de impurezas. Em seguida, as amostras foram secas à temperatura ambiente por 24 h e em

estufa a 70 °C por 60 h, processadas em moinho multiuso e armazenadas em sacos plásticos de policloreto de vinila (PVC) devidamente identificados. A Figura 4 apresenta o aspecto físico das sementes após as etapas de lavagem, secagem e moagem.

Figura 4. Foto ilustrativa das sementes oleaginosas processadas em moinho: (a) canola, (b) crambe, (c) pinhão-manso e (d) girassol.



Fonte: Próprio autor.

A extração dos óleos vegetais foi realizada utilizando 1320 g de pinhão-manso, 1653 g de girassol, 1767 g de crambe e 1680 g de canola, divididas em cartuchos com capacidade para conter 250 g de amostra, submetidas ao refluxo com 600 mL de hexano a 70 °C por 6 h (Figura 5). Em seguida o balão contendo óleo vegetal + solvente foi conduzido ao evaporador rotativo para a remoção do hexano utilizado. O óleo vegetal bruto foi submetido ao processo de degomagem, que foi realizado pelo aquecimento do óleo vegetal a 60 °C, seguido pela adição de H₂O (correspondente a 3,0% (v/v) do volume de óleo utilizado), agitação por 30 min e adição de 1,0% (v/v) de H₃PO₄. Para obtenção da fase sedimentada foi realizada a centrifugação por 30 min a 3600 rpm. O óleo vegetal foi transferido para frascos de vidro âmbar com tampa e armazenado sob refrigeração.

Figura 5. Foto ilustrativa do sistema *soxhlet* utilizado para a extração dos óleos vegetais.

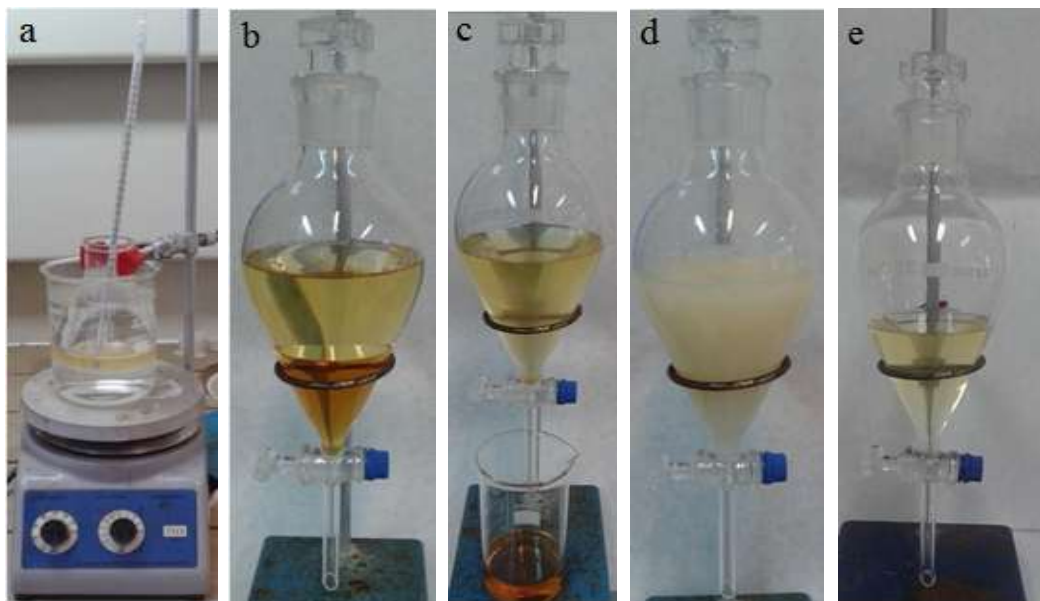


Fonte: Próprio autor.

4.4 Processo de obtenção do biodiesel

A reação de transesterificação foi realizada adicionando a solução aquecida (45 °C) de metóxido de potássio – produzida a partir de 45 mL de metanol + 1,5 g de KOH – à massa de 100 g de óleo vegetal aquecido a 45 °C. A mistura (óleo vegetal + metóxido de potássio) contida em béquer de 500 mL foi agitada manualmente e de forma constante por 90 minutos. Ao término da reação, o produto final foi transferido para um funil de decantação para a completa separação das fases biodiesel e glicerol, o qual permaneceu por 12 horas. Após a decantação, a fase inferior (glicerol) foi separada e devidamente descartada, e a parte superior (biodiesel) foi reservada. O biodiesel produzido foi lavado com 30 mL de água destilada para a remoção de possíveis contaminantes e com 15 mL de solução saturada de cloreto de sódio [36% (m/v)] para aumentar a força iônica do meio e diminuir a solubilidade de outros íons presentes. Para o processo de secagem, foi utilizado 10,0 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) seguido de filtração a vácuo. Para evitar a oxidação do material, foi adicionado o antioxidante propil galato (PG) em cada uma das amostras de modo a conter 500 mg kg^{-1} [198]

Figura 6. Etapas para obtenção do biodiesel por meio da reação de transesterificação: (a) adição da solução aquecida de metóxido de potássio ao óleo vegetal (b) separação das fases biodiesel e glicerol (c) descarte do glicerol, (d) lavagem do biodiesel com solução saturada de NaCl e (e) biodiesel bruto obtido.



Fonte: Próprio autor.

4.5 Caracterização físico-química e cromatográfica do biodiesel

Para a caracterização preliminar do biodiesel produzido em laboratório a partir da transesterificação metílica do óleo de canola, crambe, girassol e pinhão-manso, ensaios físico-químicos como massa específica, índice de acidez, teor de umidade e viscosidade cinemática foram efetuados.

Para avaliar a massa específica (densidade) de cada biodiesel produzido, o volume de 10,0 mL, a 25 °C, foi pesado e a densidade calculada por meio da razão massa/volume de cada material.

O índice de acidez foi determinado pela titulação de aproximadamente 1,0000 g (\pm 0,0001 g) de amostra preparada em meio de 15 mL de uma solução etanol:água [3:2 (v/v)] com solução padronizada de 0,1008 mol L⁻¹ de KOH. A solução 1,0% de fenolftaleína foi utilizada como indicador.

Para avaliar o teor de umidade das amostras, massas de aproximadamente 5,0000 g (\pm 0,0001 g) foram pesadas em cadinhos de porcelana (previamente calcinados a 800 °C por 30 min), e submetidas ao aquecimento a 105 °C em estufa por 60 minutos. Essas amostras foram tampadas e conduzidas até um dessecador para atingirem a temperatura ambiente e os cadinhos foram novamente pesados. Pela subtração da massa do cadinho contendo a amostra com a massa do cadinho vazio pesado anteriormente, obteve-se a massa da amostra.

Para determinar a viscosidade cinemática, o volume de 15 mL de amostra foi submetido ao aquecimento a 40 °C. Neste, a amostra foi inserida em um tubo de vidro em forma de U e a vazão de escoamento do material foi medida em função do tempo.

A conversão dos triglicerídeos em ésteres metílicos, ou seja, a confirmação da produção de biodiesel, de forma qualitativa, a partir das matrizes selecionadas foi monitorada por meio da cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando uma mistura de hexano:éter etílico:ácido acético [8:2:1 (v/v)] como eluente e uma placa cromatográfica contendo sílica como fase estacionária. Foi aplicada uma gota de cada óleo vegetal e biodiesel nas placas cromatográficas com o auxílio de um capilar de vidro de 1,0 mm de diâmetro interno, com distância de 1,0 cm entre cada aplicação e de 0,5 cm da borda inferior da placa. As placas cromatográficas foram conduzidas para cubas de vidro contendo o eluente. Após 10 min as placas foram retiradas e reveladas em vapor de iodo.

4.6 Método para determinação de Ca, Mg, Na e K em biodieseis por F AAS e F AES

4.6.1 Avaliação da análise estatística multivariada na otimização dos parâmetros de extração da R-DLLME

Um planejamento fatorial completo 2^4 com quatro fatores e dois níveis, produzindo 16 experimentos executados de forma aleatória e em duplicata, foi empregado para verificar a significância das variáveis na eficiência da R-DLLME. As variáveis massa (1,0 e 3,0 g), volume da solução extratora (300 e 1000 μL), composição da solução extratora [HNO_3 :álcool isopropílico 3:1 (v/v) e 1:3 (v/v)] e concentração de HNO_3 na solução extratora (0,5 e 5,0%) foram avaliadas, utilizando uma solução de 20 mg L^{-1} Na-P-K-Ca-Mg padrão organometálico em biodiesel B100. Os brancos utilizados na análise estatística foram preparados de acordo com o volume da solução extratora, a composição e concentração de HNO_3 em cada um dos experimentos realizados para obter o diagrama de Pareto e a matriz de *Doehlert*.

Após a realização dos experimentos, as recuperações (%) obtidas para cada analito foram avaliadas por meio do diagrama de Pareto, de modo a verificar a influência da resposta experimental de cada variável independente e a interação entre estas, ao nível de 95% de confiança. Com base nos resultados obtidos no diagrama de Pareto, as variáveis mais significativas, ou seja, aquelas com maior influência no sistema de extração foram avaliadas utilizando a metodologia de superfície de resposta utilizando a matriz de *Doehlert*. Na matriz de *Doehlert* o ponto central foi realizado em triplicata para a avaliação do erro experimental. Todo planejamento foi realizado com auxílio do *software Statistica*[®] 10.

4.6.2 Aplicação da R-DLLME em amostras de biodiesel

A extração dos analitos foi feita utilizando a R-DLLME otimizada com auxílio da análise estatística multivariada. O procedimento consistiu em pesar massas de 3,0000 g ($\pm 0,0001 \text{ g}$) do biodiesel de canola, crambe, girassol e pinhão-mansão em tubos para centrifugação cônico tipo *Falcon* de 50 mL. Estas amostras foram submetidas ao aquecimento em Banho Maria a 80 °C. Ao atingir 80 °C, foram adicionados 780 μL da solução extratora composta por 5,0% (v/v) ácido nítrico:álcool isopropílico [3:1 (v/v)] às amostras. A mistura biodiesel + solução extratora foi mantida sob aquecimento por mais 5 min. Em seguida a mistura foi submetida à agitação em *vórtex* por 30 s, banho de ultrassom aquecido a 45 °C por 3 min e, por fim, centrifugadas a 3600 rpm por 15 min. Após esse procedimento, pode-se observar a formação da gota no fundo do tubo cônico. Toda solução sobrenadante foi

removida e devidamente descartada, e a gota resultante foi avolumada para 5,0 mL com água ultrapura. Os brancos de amostra foram preparados pela adição dos mesmos reagentes, na ausência da amostra, utilizando as condições otimizadas da R-DLLME, ou seja, 780 µL da solução extratora composta por 5,0% (v/v) ácido nítrico:álcool isopropílico [3:1 (v/v)].

O procedimento de preparo de amostra estabelecido com a R-DLLME e o método empregado para determinação dos teores de Ca, Mg, Na e K em biodiesel foi avaliado por meio do cálculo dos seguintes parâmetros de confiabilidade analítica: sensibilidade, intervalo linear de trabalho, precisão, exatidão, coeficientes de correlação lineares e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de acordo com o método descrito por Currie [199] empregando os programas *Microsoft Office Excel*[®] e *Microcal OriginPro*[®] como ferramentas de cálculo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração do óleo vegetal e produção de biodiesel

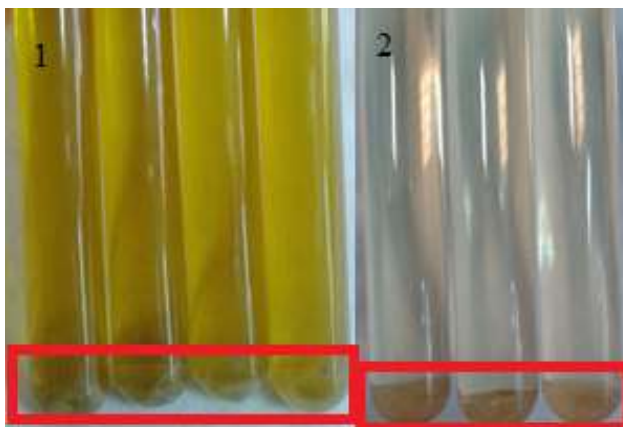
É recomendado utilizar a prensa hidráulica na extração do óleo vegetal de espécies oleaginosas, pois com esse procedimento se obtém um produto com as propriedades naturais preservadas [200], além de evitar o uso de solventes de elevada toxicidade. No entanto, devido à baixa granulometria das amostras avaliadas neste trabalho, somente a extração em sistema *soxhlet* pôde ser utilizada. A extração do óleo vegetal das amostras apresentou rendimento entre 35,5 – 43,3%, como descrito na Tabela 4. Os valores apresentados neste trabalho foram comparados com os resultados apresentados em literatura específica (Tabela 4), e somente para canola pode-se observar valor de rendimento ligeiramente inferior ao descrito em literatura [57,74,201,202].

Tabela 4. Quantidade de óleo vegetal extraído das espécies canola, crambe, girassol e pinhão-manso utilizando o sistema de extração em *soxhlet*.

Amostra	Massa de semente, g	Massa de óleo vegetal, g	Rendimento, %	Literatura, %
Canola	1679,8	571,13	35,5 ± 2,8	38 – 46 [201]
Crambe	1767,4	671,61	38,4 ± 2,6	38 [57]
Girassol	1653,3	644,79	40,3 ± 5,1	35 – 45 [202]
Pinhão-manso	1318,9	514,37	43,3 ± 1,3	43 – 59 [74]

O volume de óleo vegetal obtido para cada amostra foi submetido ao processo de degomagem – em meio aquoso e em meio ácido – para remoção de fosfatídeos, proteínas e substâncias mucilaginosas que contribuem para a degradação de óleos [203]. A separação da matriz oleosa das substâncias indesejáveis foi feita por meio de centrifugação, e o resultado do processo pode ser observado na Figura 7.

Figura 7. Foto ilustrativa da amostra de óleo de canola (1) e pinhão-manso (2) após serem submetidas ao processo de degomagem. A fase sedimentada e destacada em vermelho corresponde à fração que contém fosfatídeos, proteínas e substâncias mucilaginosas.



Fonte: Próprio autor.

Em virtude do processo de degomagem, observou-se uma diminuição da massa de óleo vegetal obtida para todas as amostras. A redução da massa de óleo vegetal após processo de degomagem deve-se ao fato da retirada dos fosfatídeos hidratáveis e não-hidratáveis e ainda de outros materiais adsorvidos, como impurezas [204]. A redução da massa de óleo vegetal pode ser observada na Tabela 5.

O óleo vegetal bruto, obtido após processo de degomagem, foi submetido à reação de transesterificação por meio da rota metílica de acordo com o processo descrito anteriormente. A massa de biodiesel produzido para cada amostra, bem como o rendimento obtido, pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Massa de biodiesel obtido por catálise alcalina e rota metílica para os óleos vegetais estudados.

Amostras	Massa de óleo vegetal bruto, g	Massa de óleo degomado, g	Massa de biodiesel, g	Rendimento, %
Canola	571,13	316,39	240,46	75,7 ± 3,6
Crambe	671,61	491,86	329,55	65,8 ± 2,9
Girassol	644,79	494,95	376,16	75,9 ± 3,1
Pinhão-manso	514,37	354,52	255,25	72,3 ± 3,1

Pode-se observar na Tabela 5 que os maiores rendimentos foram obtidos para os óleos de canola e girassol (75,7% e 75,9). No entanto, rendimentos satisfatórios, para o objetivo deste trabalho, também foram obtidos para os óleos de pinhão-manso (72,3%) e crambe

(65,8%). A quantidade obtida de biodiesel para cada amostra foi suficiente para a continuidade do trabalho.

5.2 Caracterização físico-química do biodiesel

Alguns parâmetros físico-químicos são de extrema importância na caracterização do material produzido, uma vez que estes permitem garantir, com base em legislações vigentes, a qualidade do produto. Neste sentido, em escala laboratorial, foram realizados testes físico-químicos nas amostras de biodiesel de canola, crambe, girassol e pinhão-manso com ênfase na determinação da massa específica, do índice de acidez, do teor de umidade e da viscosidade cinemática. Os valores obtidos nestes parâmetros (Tabela 6) foram comparados com aqueles descritos pela ANP por meio da Resolução ANP 45/2014 [16].

Tabela 6. Parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de biodiesel.

Amostra	Massa específica (kg m ⁻³)	Índice de acidez (mg KOH g ⁻¹)	Teor de umidade (mg kg ⁻¹)	Viscosidade cinemática a 40 °C (mm ² s ⁻¹)
Canola	852	0,4	400	3,3
Crambe	859	0,2	300	4,8
Girassol	858	0,4	300	3,3
Pinhão-manso	855	0,2	400	3,2
*ANP 45/2014¹⁶	850-900	<0,5	<200	3,0-6,0

Os resultados obtidos para massa específica nas amostras de biodiesel ficaram compreendidos entre 852 e 859 kg m⁻³, e se enquadraram no intervalo estabelecido pela ANP (850 a 900 kg m⁻³) [16]. Quanto maior a massa específica do biodiesel, maior é a sua cadeia carbônica de alquiléster e menor é o número de insaturações na molécula [86]. No entanto, é importante destacar que a presença de impurezas (p.ex. álcool) pode contribuir para o aumento da massa específica [86]. A massa específica influencia na potência de saída do motor, no consumo de combustível, no início e pressão de injeção e nas características de pulverização do combustível [205].

Os valores de índice de acidez de todas as amostras ficaram abaixo do limite estabelecido pela ANP (<0,5 mg KOH g⁻¹) [16]. Neste parâmetro foi avaliada a massa de hidróxido de potássio necessária para neutralizar 1,0 g de amostra, e que este consumo está relacionado com os ácidos graxos livres formados pela hidrólise de ligações de ésteres de

monoglicerídeos. Os ácidos graxos indicam o envelhecimento, oxidação e degradação do biodiesel, por isso altos índices de acidez podem promover a corrosão e a formação de depósitos de sedimentos em peças do motor, e também podem provocar a redução do tempo de vida de bombas de combustíveis e filtros [206].

Quanto à análise do teor de umidade, foi observado que todos os valores não estão em conformidade com o limite máximo (200 mg kg^{-1}) permitido pela ANP [16]. Estes resultados podem ser atribuídos à estufa utilizada para secar as amostras de biodieseis. O indicado era verificar a temperatura interna com um termômetro apropriado antes de iniciar o procedimento, e não somente estabelecer a temperatura no controlador digital do equipamento. A presença de água pode promover a hidrólise do biodiesel, o que resulta em ácidos graxos livres, facilita a proliferação de micro-organismos e promove a corrosão de tanques de estocagem por meio da deposição de sedimentos [86].

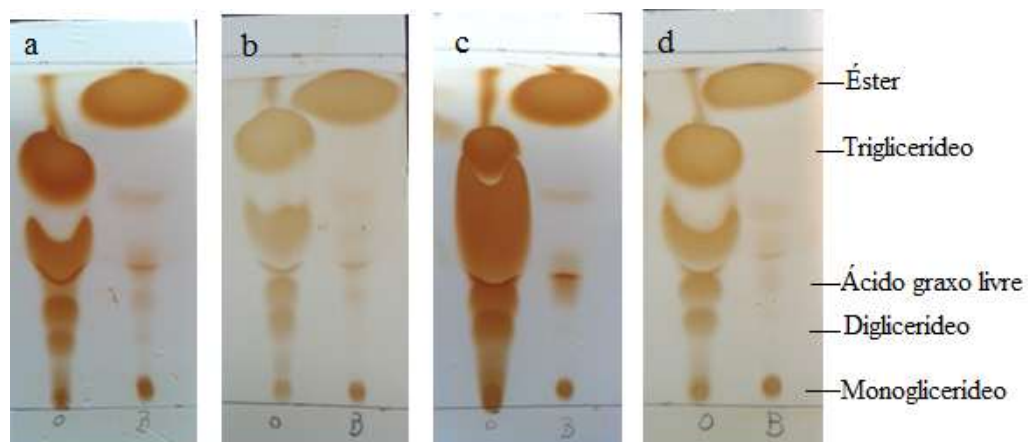
A viscosidade cinemática expressa a resistência ao escoamento de um fluido sob a gravidade. Este parâmetro, determinado com auxílio de equipamentos específicos, é obtido por meio do produto entre tempo de fluxo medido e a constante de calibração do viscosímetro. Os valores obtidos (Tabela 6) para a viscosidade cinemática nas amostras apresentam valores entre $3,2 - 4,8 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$, e estão dentro do intervalo estabelecido pela ANP ($3,0 \text{ a } 6,0 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$) [16]. A elevada viscosidade do biodiesel pode causar pressão excessiva de injeção do biocombustível durante o aquecimento do motor e aumentar a entrada de biodiesel na câmara [207]. Além disso, este parâmetro afeta o processo de combustão do biodiesel nos cilindros [207].

De acordo com os resultados descritos acima, e levando-se em consideração as exigências estabelecidas pela ANP para conferir qualidade ao biodiesel, pode-se observar que os valores de massa específica, índice de acidez e viscosidade cinemática estão em conformidade com a normativa. Somente o parâmetro umidade não está em conformidade com a legislação vigente. É importante destacar que esta última normativa (ANP 45/2014) [16] diminuiu ainda mais o valor do referido parâmetro, uma vez que a normativa ANP 07/2008 [208] estabelecia um valor máximo de 500 mg kg^{-1} .

De maneira complementar, cada amostra de biodiesel foi analisada qualitativamente por meio da cromatografia em camada delgada (CCD) para verificar a conversão dos triglicerídeos em ésteres metílicos. A placa cromatográfica, utilizada como fase polar e estacionária, foi recoberta com sílica e parcialmente imersa em uma solução menos polar contendo hexano:éter etílico:ácido acético [8:2:1 (v/v/v)]. Cada placa continha o óleo vegetal e o respectivo biodiesel. Dessa forma, os triglicerídeos presentes nos óleos vegetais

apresentam maior polaridade em relação aos ésteres metílicos devido à presença dos três grupos $-CO_2R$ em sua estrutura, e tiveram maior afinidade pela fase estacionária. Em comparação com os triglicerídeos, os ésteres metílicos apresentam menor polaridade por apresentarem um único grupo acila e percorreram uma distância maior, devido a maior afinidade pelo eluente, como pode ser verificado na Figura 8.

Figura 8. Placas cromatográficas eluídas com hexano:éter etílico:ácido acético [8:2:1 (v/v/v)] e reveladas com vapor de iodo: (a) óleo e biodiesel de canola, (b) óleo e biodiesel de crambe, (c) óleo e biodiesel de girassol e (d) óleo e biodiesel de pinhão-manso.



Fonte: Próprio autor.

Pela análise das placas cromatográficas pode-se verificar a diferença no comportamento dos óleos em relação aos respectivos biodieseis produzidos, o que permite inferir que o material produzido (biodiesel) é diferente do produto de partida (óleo vegetal). Este é um indicativo de que a reação de transesterificação foi eficiente e satisfatória.

Por meio dos resultados da caracterização físico-química, verificou-se que os biodieseis obtidos encontram-se dentro dos padrões de qualidade especificados pela ANP, exceto pelo teor de umidade que se mostrou superior ao valor estabelecido. A CCD, por sua vez, comprovou a conversão dos óleos vegetais em biodieseis de forma simples e eficaz.

Após a verificação da qualidade dos biodieseis produzidos com base nos testes físico-químicos, prosseguiu-se com a otimização quimiométrica da microextração líquido-líquido dispersiva reversa, para realizar a extração e posterior determinação dos analitos de interesse.

5.3 Análise estatística multivariada aplicada na otimização da R-DLLME

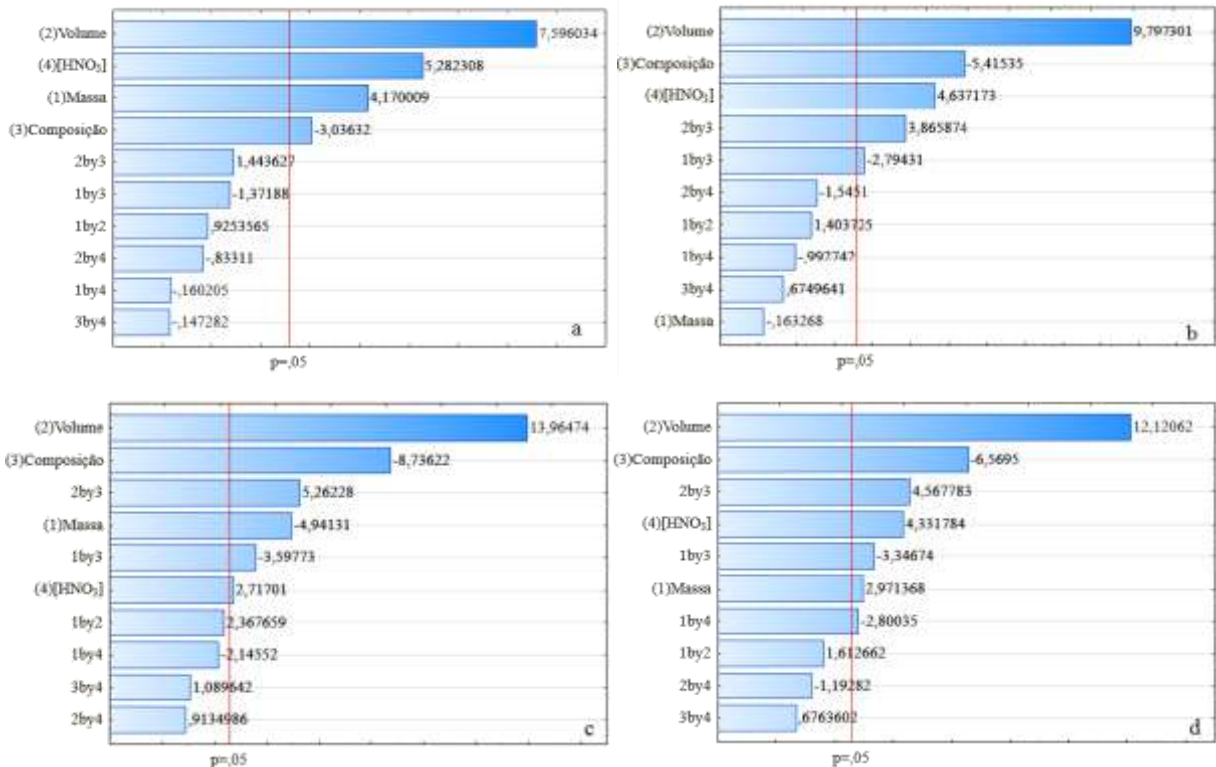
Definir as melhores condições da R-DLLME para obter eficiência satisfatória no procedimento de preparo de amostra envolve avaliar vários fatores, e muitas vezes conduzem a ensaios experimentais desnecessários. Para estabelecer as melhores condições da R-DLLME para a extração de Ca, Mg, Na e K em amostras de biodiesel, a análise estatística multivariada foi aplicada na otimização de fatores com influência significativa no sistema de DLLME utilizando a solução de 20 mg L⁻¹ padrão organometálico em biodiesel B100. Um planejamento fatorial completo 2⁴, compreendendo 16 experimentos realizados em duplicata, cuja ordem dos ensaios foi realizada de maneira aleatória para eliminar os possíveis erros sistemáticos. A Tabela 7 apresenta as variáveis estudadas, os valores estabelecidos como níveis mínimos e máximos, bem como os valores de recuperação (%) obtidos para o Ca, Mg, Na e K em cada um dos experimentos. As condições temperatura do Banho Maria (80 °C), tempo de agitação no *vórtex* (30 s), tempo de sonicação (3 min) e tempo de centrifugação (15 min a 3600 rpm) foram mantidas fixas de acordo com trabalhos da literatura [88,97]. Fixar a temperatura do Banho Maria em 80 °C permitiu realizar a abertura da matriz orgânica do biodiesel, facilitando a interação da amostra com a solução extratora, e evitou perdas de álcool isopropílico por volatilização, uma vez que o ponto de ebulição deste é de 80 - 83 °C [209]. O tempo de agitação no *vórtex* de 30 s foi o menor e também o suficiente para formar a emulsão do biodiesel com a solução extratora. O tempo de 3 min de sonicação da mistura em banho de ultrassom permitiu que microgotas menores do solvente extrator fossem formadas. A centrifugação realizada por 15 min promoveu a completa sedimentação da gota formada pela solução extratora contendo os analitos. Os dados experimentais foram analisados no *software Statistica*[®] 10 e a porcentagem de recuperação (%) foi utilizada como resposta para gerar os gráficos de Pareto (Figura 9) e assim, verificar a influência das variáveis selecionadas e suas interações para cada elemento.

Tabela 7. Planejamento fatorial completo de 2^4 utilizado para otimizar os parâmetros experimentais da R-DLLME para a determinação de Ca, Mg, Na e K.

Fatores					Nível			
					Baixo (-)		Alto (+)	
Massa (g)					1,0		3,0	
Volume (µL)					300		1000	
Ácido nítrico:álcool isopropílico (v/v)					3:1		1:3	
HNO ₃ (%)					0,5		5,0	

Exp.	Massa	Volume	Composição	HNO ₃	Recuperação, %			
					Ca	Mg	Na	K
1	-	-	-	-	20,27	70,83	103,00	62,43
2	+	-	-	-	44,61	82,84	96,62	86,54
3	-	+	-	-	39,45	87,67	108,80	79,00
4	+	+	-	-	92,99	112,40	122,80	113,25
5	-	-	+	-	14,00	36,73	68,00	33,22
6	+	-	+	-	5,45	24,00	46,71	38,81
7	-	+	+	-	56,60	103,20	115,50	90,45
8	+	+	+	-	70,44	92,45	100,60	94,00
9	-	-	-	+	46,11	92,08	103,80	82,42
10	+	-	-	+	78,22	92,25	91,65	87,04
11	-	+	-	+	90,23	113,80	130,80	101,80
12	+	+	-	+	104,60	118,95	121,60	112,71
13	-	-	+	+	36,16	76,70	86,09	67,29
14	+	-	+	+	47,07	52,20	51,22	48,86
15	-	+	+	+	65,95	105,85	124,30	97,00
16	+	+	+	+	98,54	106,55	108,1	101,90

Figura 9. Diagrama de Pareto gerado a partir do planejamento fatorial completo 2^4 para a determinação de (a) Ca, (b) Mg, (c) Na e (d) K por F AAS e F AES ($p < 0,05$).



Fonte: Próprio autor.

Nota-se que pelos resultados obtidos com o diagrama de Pareto para os quatro analitos avaliados (Figura 9a-d) o fator principal volume de solução extratora foi a variável mais significativa, com efeito positivo, na extração dos analitos utilizando a R-DLLME, ao nível de 95 % de confiança. Isso se deve ao fato que um maior volume de solução extratora (1000 μ L) favorece a extração dos analitos da matriz oleosa para a fase aquosa. Já o fator composição da solução extratora apresentou maior influência no sistema de R-DLLME quando estudada em seu menor nível [5,0%, (v/v) ácido nítrico:álcool isopropílico, 3:1 (v/v)]. Este resultado indica que a extração dos metais é favorecida quando a solução extratora contém uma proporção mais elevada de ácido que solvente orgânico. No sistema de R-DLLME proposto, o ácido nítrico funciona como um solvente extrator, e quando este é aumentado na composição da solução extratora, a extração dos analitos de interesse também aumenta, uma vez que os íons metálicos tendem a migrar da fase orgânica para a fase aquosa ácida por partição. A transferência dos analitos da fase orgânica para a fase aquosa acontece rapidamente e logo se atinge o equilíbrio da solução [88]. Já o álcool isopropílico age como solvente dispersor, cuja finalidade é de interagir tanto com o biodiesel (fase

orgânica) quanto com o ácido nítrico (fase aquosa) e promover a dispersão do ácido na forma de microgotas. Sendo assim, a composição da solução extratora foi fixada na proporção 3:1 (v/v).

Além disso, foi possível observar que para os elementos Mg, Na e K, a interação entre as variáveis volume e composição da solução extratora, denominada como interação $2by3$, também apresentou influência significativa no procedimento de extração dos íons metálicos por R-DLLME, corroborando com o resultado no qual o volume de solução extratora exerce maior influência na extração em estudo utilizando a R-DLLME.

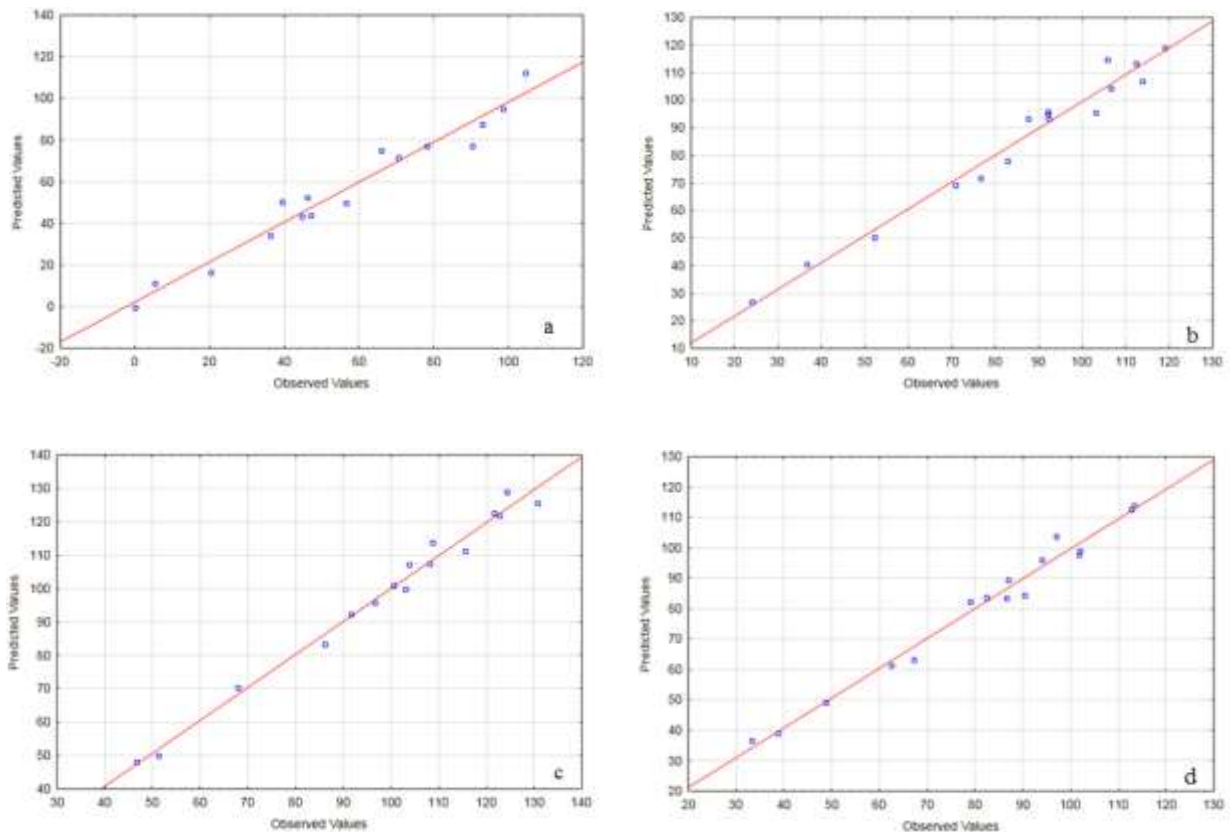
Com relação a variável concentração da solução de ácido nítrico, a mesma foi significativa para todos os analitos estudados em seu maior nível no domínio experimental [5,0%, (v/v)]. Isso ocorre devido ao fato do ácido exercer papel fundamental na extração de íons metálicos, sendo responsável pela transferência dos íons metálicos, ligados em matrizes oleosas na forma de moléculas organometálicas ou complexos orgânicos, da matriz orgânica para a fase aquosa [83,109].

No tocante à influência da variação da massa utilizada para avaliar a resposta da R-DLLME na extração de Ca, Mg, Na e K em biodiesel, pode-se observar que a massa de 3,0 g apresentou influência no procedimento avaliado somente para Ca e K, enquanto que a massa de 1,0 g foi significativa para Na e não significativa para Mg, ao nível de 95 % de confiança. No entanto, com base na sensibilidade da técnica de absorção atômica e na possibilidade de pré-concentração dos analitos no processo de R-DLLME, a massa de 3,0 g foi utilizada e fixada nos experimentos posteriores. Ainda, com menor influência na R-DLLME, a interação massa de amostra e composição da solução extratora, denominada como interação $1by3$, foi significativa para todos os analitos, exceto para Ca, ao nível de 95 % de confiança. Com base nisso, e no fato que a massa de amostra exerce menor influência no procedimento de extração, torna-se possível inferir que a composição da solução extratora é mais significativa no sistema.

Embora as variáveis independentes massa de amostra, volume da solução extratora, composição da solução extratora e concentração de ácido nítrico na solução extratora tenham efeito significativo no sistema de extração por R-DLLME, as interações entre $1by4$ (massa de amostra e concentração de ácido nítrico na solução extratora), $1by2$ (massa de amostra e volume da solução extratora), $2by4$ (volume da solução extratora e concentração de ácido nítrico na solução extratora) e $3by4$ (composição da solução extratora e concentração de ácido nítrico na solução extratora) não apresentaram efeito significativo ao nível de 95% de confiança.

De forma complementar e para ilustrar o modelo aplicado, foi verificada a concordância entre os valores obtidos experimentalmente (valores observados) e os estabelecidos pelo método linear (valores preditos). O resultado está ilustrado na Figura 10.

Figura 10. Gráfico de valores preditos vs valores observados obtido para a determinação de (a) Ca, (b) Mg, (c) Na e (d) K.



Fonte: Próprio autor.

A boa correlação entre os valores preditos e observados permite afirmar que o modelo aplicado está bem ajustado aos dados experimentais obtidos no planejamento, uma vez que a resposta mostra uma tendência para a distribuição normal dos valores.

De acordo com os resultados apresentados no diagrama de Pareto e pela influência que as variáveis principais volume da solução extratora e concentração de ácido nítrico na composição da solução extratora exercem no procedimento da R-DLLME, estas foram avaliadas por meio da aplicação da matriz de *Doehlert* para duas variáveis, com ponto central. Como pode ser visto na Tabela 8, por apresentar maior significância para os quatro analitos determinados utilizando o procedimento de R-DLLME, a variável volume da solução extratora foi avaliada em cinco níveis (400 – 600 – 800 – 1000 – 1200 μL), enquanto que a concentração de HNO_3 em três níveis (3,0 – 5,0 – 7,0% (v/v)). Para avaliar o erro

experimental, o ponto central foi realizado em triplicata. Os testes com a matriz de *Doehlert* foram efetuados com o padrão organometálico de Biodiesel B100.

Tabela 8. Matriz de experimentos do planejamento *Doehlert* utilizada para estabelecer as condições experimentais da R-DLLME para a determinação de Ca, Mg, Na e K.

Exp.	Volume, μL	HNO_3 , %	Recuperação, %			
			Ca	Mg	Na	K
1	800 (0)	5,0 (0)	106,00	102,07	106,08	101,91
2	800 (0)	5,0 (0)	106,63	102,94	109,50	103,48
3	800 (0)	5,0 (0)	107,17	102,44	107,85	103,56
4	1200 (1,0)	5,0 (0)	60,51	99,19	106,21	97,43
5	1000 (0,5)	7,0 (0,866)	61,95	95,84	101,41	97,17
6	400 (-1,0)	5,0 (0)	65,74	72,00	96,61	87,12
7	600 (-0,5)	3,0 (-0,866)	65,62	87,39	93,98	87,08
8	1000 (0,5)	3,0 (-0,866)	58,37	93,59	96,65	83,66
9	600 (-0,5)	7,0 (0,866)	65,27	78,21	95,39	76,14

Os números entre parênteses referem-se aos valores codificados.

Os resultados da matriz de *Doehlert* foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), e os respectivos modelos quadráticos (Equação 1 - 4) foram obtidos para a resposta analítica referente ao volume da solução extratora e concentração de HNO_3 na composição da solução extratora para cada elemento.

$$\begin{aligned} \% \text{ Rec.} = & -258,288 + 0,414(V) - 0,000(V)^2 + 80,761(\text{HNO}_3) - 8,232(\text{HNO}_3)^2 \\ & (\pm 4,55) \quad (\pm 0,0065) \quad (\pm 0,000003) \quad (\pm 1,17) \quad (\pm 0,100) \end{aligned}$$

(Eq. 1 - Ca)

$$\begin{aligned} \% \text{ Rec.} = & -17,632 + 0,1658(V) - 0,0001(V)^2 + 17,1781(\text{HNO}_3) - 2,376(\text{HNO}_3)^2 \\ & (\pm 3,39) \quad (\pm 0,0048) \quad (\pm 0,000002) \quad (\pm 0,872) \quad (\pm 0,0747) \end{aligned}$$

(Eq. 2 - Mg)

$$\begin{aligned} \% \text{ Rec.} = & +18,979 + 0,06515(V) - 0,00004(V)^2 + 22,4775(\text{HNO}_3) - 2,338(\text{HNO}_3)^2 \\ & (\pm 13,28) \quad (\pm 0,01908) \quad (\pm 0,00001) \quad (\pm 3,417) \quad (\pm 0,2928) \end{aligned}$$

(Eq. 3 - Na)

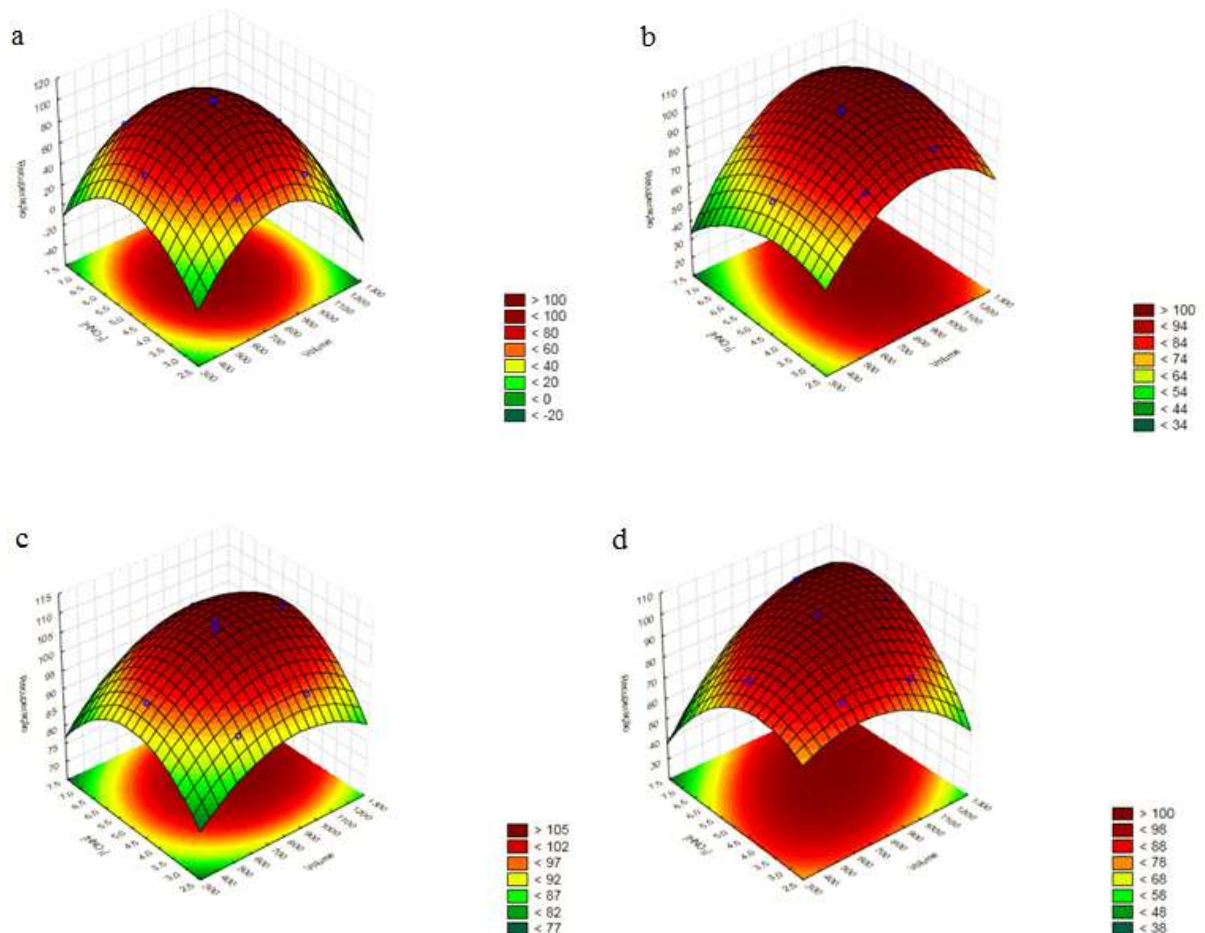
$$\% \text{ Rec.} = +17,589 + 0,0466(V) - 0,00007(V)^2 + 23,8306(\text{HNO}_3) - 3,573(\text{HNO}_3)^2$$

$$(\pm 7,23) \quad (\pm 0,01038) \quad (\pm 0,000005) \quad (\pm 1,8590) \quad (\pm 0,1592)$$

(Eq. 4 - K)

De acordo com a ANOVA (tabela 9, 10, 11 e 12), os valores de $F_{\text{calculado}}$ para Ca (13,86), Mg (9,87), Na (0,047) e K (10,26) foram todos menores que o valor de F_{tabelado} (18,51) [210] ao nível de 95% de confiança, confirmando a ausência de falta de ajuste dos dados experimentais ao modelo teórico proposto. Além disso, resultados obtidos para p indicam que o modelo de regressão aplicado descreve com precisão o domínio experimental estudado. Usando o modelo quadrático, as superfícies de respostas foram construídas, como pode ser visto na Figura 11.

Figura 11. Superfície de resposta obtida para a interação entre volume vs [HNO₃] vs recuperação na otimização do processo de determinação de (a) Ca, (b) Mg, (c) Na e (d) K.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 9. Análise da variância aplicada aos resultados experimentais descritos na Tabela 8 para determinação de Ca.

	SQ	GL	MQ	F	P
1 Volume (L)	36,855	1	36,855	107,481	0,009176
Volume (Q)	2268,091	1	2268,091	6614,438	0,000151
(2) [HNO₃] (L)	2,608	1	2,608	7,606	0,110166
[HNO₃] (Q)	2313,179	1	2313,179	6745,928	0,000148
1L by 2L	3,861	1	3,861	11,260	0,078492
Falta de ajuste	4,753	1	4,753	13,860	0,065176
Erro puro	0,686	2	0,343		
Total SS	3866,534	8			

SQ = soma quadrática, **GL** = grau de liberdade, **MQ** = média quadrática, **P** = nível de probabilidade.

Tabela 10. Análise da variância aplicada aos resultados experimentais descritos na Tabela 8 para determinação de Mg.

	SQ	GL	MQ	F	P
1 Volume (L)	509,734	1	509,7337	2673,896	0,000374
Volume (Q)	342,259	1	342,2590	1795,378	0,000557
(2) [HNO₃] (L)	12,006	1	12,0062	62,981	0,015509
[HNO₃] (Q)	192,685	1	192,6854	1010,764	0,000988
1L by 2L	32,661	1	32,6612	171,330	0,005786
Falta de ajuste	1,882	1	1,8816	9,870	0,088127
Erro puro	0,381	2	0,1906		
Total SS	1006,896	8			

SQ = soma quadrática, **GL** = grau de liberdade, **MQ** = média quadrática, **P** = nível de probabilidade.

Tabela 11. Análise da variância aplicada aos resultados experimentais descritos na Tabela 8 para determinação de Na.

	SQ	GL	MQ	F	P
1 Volume (L)	64,8210	1	64,8210	22,15876	0,042287
Volume (Q)	49,1520	1	49,1520	16,80238	0,054680
(2) [HNO₃] (L)	9,5172	1	9,5172	3,25342	0,2113047
[HNO₃] (Q)	186,6011	1	186,6011	63,78870	0,015317
1L by 2L	2,8056	1	2,8056	0,95909	0,430688
Falta de ajuste	0,1380	1	0,1380	0,04718	0,848189
Erro puro	5,8506	2	2,9253		
Total SS	288,8046	8			

SQ = soma quadrática, **GL** = grau de liberdade, **MQ** = média quadrática, **P** = nível de probabilidade.

Tabela 12. Análise da variância aplicada aos resultados experimentais descritos na Tabela 8 para determinação de K.

	SQ	GL	MQ	F	P
1 Volume (L)	121,7944	1	121,7944	140,6998	0,007032
Volume (Q)	137,6021	1	137,6021	158,9612	0,006232
(2) [HNO₃] (L)	1,6512	1	1,6512	1,9075	0,301310
[HNO₃] (Q)	435,8641	1	435,8641	503,5204	0,001980
1L by 2L	149,4506	1	149,4506	172,6489	0,005742
Falta de ajuste	8,8817	1	8,8817	10,2603	0,085193
Erro puro	1,7313	2	0,8656		
Total SS	778,8283	8			

SQ = soma quadrática, **GL** = grau de liberdade, **MQ** = média quadrática, **P** = nível de probabilidade.

Diante dos resultados obtidos com a avaliação multivariada, as melhores condições obtidas para volume de solução extratora e concentração de HNO₃ na composição da solução extratora ácido nítrico:álcool isopropílico [3:1 (v/v)] para a R-DLLME foram 780 µL e 5,0 % (v/v), respectivamente. Desta maneira, adotaram-se as condições estabelecidas pela

matriz de *Doehlert* para volume de solução extratora e concentração de HNO_3 , uma massa de 3,0 g, Banho Maria em 80 °C, 30 s de agitação em *vórtex*, 3 min de sonicação em banho de ultrassom e 15 min a 3600 rpm de centrifugação.

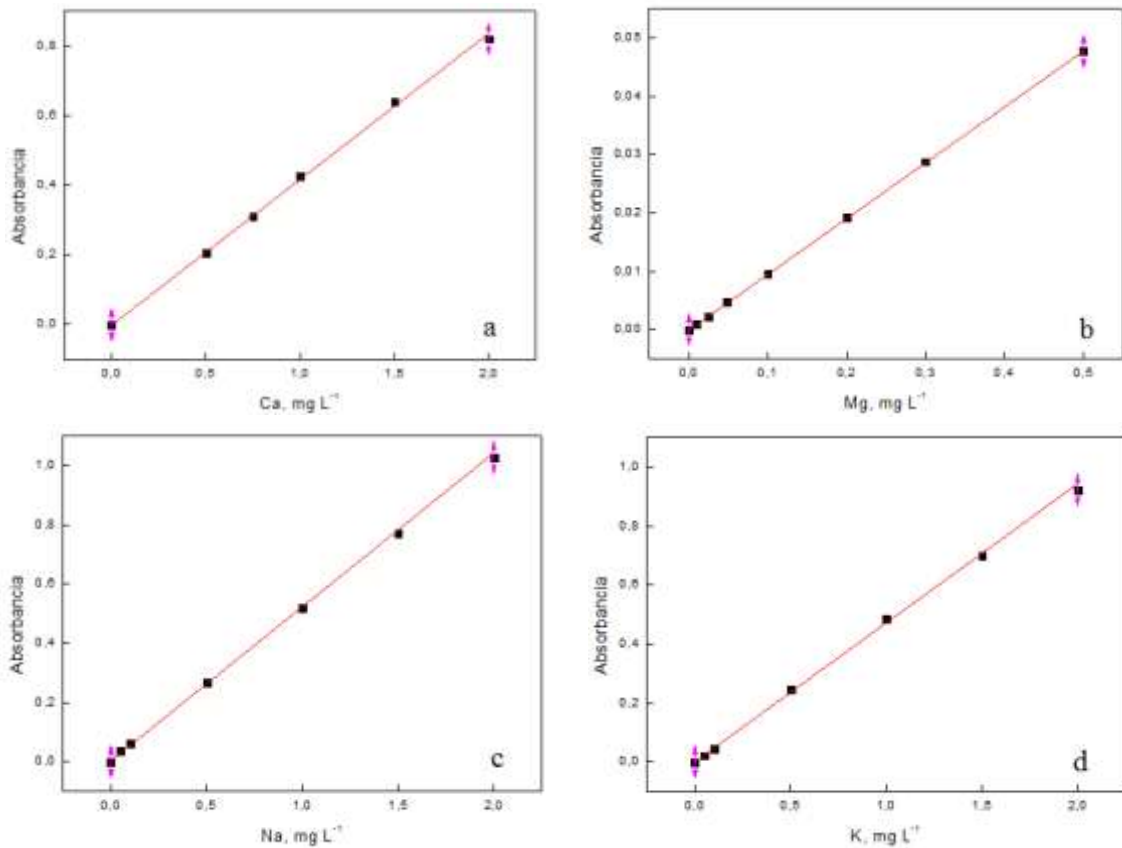
Como já mencionado anteriormente, os trabalhos envolvendo a R-DLLME ou RP-DLLME ainda são bastante incipientes. López-García *et al* (2014) determinaram o teor de Cd e Pb por ET AAS em amostras de óleos comestíveis utilizando a RP-DLLME como procedimento de preparo de amostra. Segundo os autores, foram necessários 10 g de amostra, 300 μL da solução extratora e a composição álcool isopropílico:3,0% (v/v) HNO_3 [4:1 (v/v)]. [96]. Outro trabalho realizado por López-García *et al* (2015) consistiu na determinação de compostos de arsênio (arsênio inorgânico, metilarsonato, dimetilarsonato e arsenobetaína) em óleos comestíveis por ET AAS utilizando a RP-DLLME como procedimento de preparo de amostra. Segundo os autores, foram utilizados 10 g de óleo, 300 μL da solução extratora composta por álcool isopropílico:3,0% (v/v) HNO_3 [3:1 (v/v)] [97]. É importante destacar que as matrizes utilizadas por López-García *et al* em ambos os trabalhos são diferentes das utilizadas neste trabalho. Em amostras de biodiesel, ainda não há referências que utilizam a R-DLLME como procedimento de preparo de amostra.

5.4 Método para determinação de Ca, Mg, Na e K em biodiesel por F AAS e F AES

A determinação dos analitos foi feita utilizando os parâmetros instrumentais de maior sensibilidade, de modo a possibilitar a determinação dos elementos nas amostras. Com uma taxa de aspiração fixada em 5,0 mL min^{-1} , soluções padrão no intervalo de 0,5-2,0 mg L^{-1} Ca, 0,01-0,5 mg L^{-1} Mg e 0,05-2,0 mg L^{-1} Na e K foram aspiradas para dentro do sistema nebulizador/queimador e os elementos foram atomizados com a mistura gasosa apropriada. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

A escolha deste intervalo linear de trabalho para determinação dos analitos em biodiesel foi estabelecida de acordo com o teor de Ca, Mg, Na e K presente nas amostras, de modo a obter sensibilidade satisfatória para as medidas. Utilizando os parâmetros instrumentais da Tabela 3, foi efetuada a calibração para determinação de Ca, Mg, K e Na, cujos intervalos lineares de trabalho para os elementos estão ilustrados na Figura 12.

Figura 12. Curvas analíticas típicas obtidas para Ca em 422,7 nm (a), Mg em 285,2 nm (b), K em 766,5 nm (c) e Na em 589,0 nm (d) em meio de 1,0% (v/v) HNO₃ sob as condições descritas na Tabela 3.



Fonte: Próprio autor.

Realizou-se o cálculo dos principais parâmetros de confiabilidade analítica: sensibilidade, intervalo linear de trabalho, precisão, exatidão, coeficientes de correlação linear (R) e os limites de detecção e quantificação (Tabela 13), empregando os *softwares Microsoft Excel*[®] e *Microcal OriginPro*[®] como ferramentas de cálculo, de acordo com as equações abaixo.

$$LD = \frac{3xsd_{branco}}{k} \text{ (Eq. 5)} \quad LQ = \frac{10xsd_{branco}}{k} \text{ (Eq. 6)}$$

$$RSD = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} \text{ (Eq. 7)}$$

Onde sd_{branco} é o desvio padrão de 10 ou mais medidas para o branco analítico da curva de calibração; k é o coeficiente angular; s é o desvio padrão e \bar{x} é a média dos valores.

Foram obtidos desvios padrão relativos (RSD) inferiores a 8,4% em todas as medidas e coeficientes de correlação linear (R) acima de 0,9971.

Tabela 13. Parâmetros de confiabilidade analítica relativos à determinação de Ca, Mg, Na e K em amostras de biodiesel utilizando os parâmetros descritos na Tabela 3.

Parâmetros instrumentais	Ca	Mg	Na	K
Intervalo linear (mg L⁻¹)	0,5 - 2,0	0,01 - 0,5	0,05 - 2,0	0,05 - 2,0
Sensibilidade	0,4186	0,0957	0,5203	0,4717
R	0,9988	0,9999	0,9971	0,9993
LD (mg L⁻¹)	0,0143	0,0015	0,0008	0,0009
LQ (mg L⁻¹)	0,0477	0,0049	0,0027	0,0030
RSD (%)	4,1	2,6	8,4	6,9

Analisando os valores apresentados é possível verificar que o espectrômetro de absorção/emissão atômica em chama utilizado apresentou limites de detecção e de quantificação satisfatórios, baixos valores de desvio padrão relativo e pode ser empregado na determinação dos teores dos analitos selecionados em biodiesel.

Pode-se observar na Tabela 13 que os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) alcançados neste trabalho são satisfatórios para a determinação de Ca, Mg, Na e K em amostras de biodiesel e foram comparados com outros trabalhos reportados na literatura (Tabela 14).

Tabela 14. Determinação dos metais Ca, Mg, Na e K em amostras de biodiesel e seus respectivos limites de detecção.

Técnica	Preparo de amostra	Elemento	LD	Ref.
F AAS	R-DLLME	Ca	0,0143 mg L ⁻¹	Neste trabalho
F AES		Mg	0,0015 mg L ⁻¹	
		Na	0,0008 mg L ⁻¹	
		K	0,0009 mg L ⁻¹	
F AAS	Microemulsão	Ca	0,04 mg kg ⁻¹	[19]
		Mg	0,004 mg kg ⁻¹	
		Na	0,1 mg kg ⁻¹	
		K	0,01 mg kg ⁻¹	
FS-F AAS	Extração induzida por quebra de emulsão	Ca	0,014 mg L ⁻¹	[83]
		Mg	0,004 mg L ⁻¹	
F AES	Microemulsão	Na	0,08 mg kg ⁻¹	[32]
		K	0,09 mg kg ⁻¹	
F AAS	Microemulsão	Na	0,1 mg kg ⁻¹	[25]
		K	0,06 mg kg ⁻¹	
F AAS	Microemulsão	Ca	0,11 mg L ⁻¹	[20]
		Mg	0,03 mg L ⁻¹	
ICP OES	Digestão ácida	Ca	0,40 mg kg ⁻¹	[81]
		Mg	0,02 mg kg ⁻¹	
		Na	0,16 mg kg ⁻¹	
		K	0,16 mg kg ⁻¹	
CE	---	Ca	0,12 mg L ⁻¹	[211]
		Mg	0,07 mg L ⁻¹	
		Na	0,14 mg L ⁻¹	
		K	0,12 mg L ⁻¹	
SWIA	---	Ca	0,6 mg kg ⁻¹	[84]
		Mg	0,4 mg kg ⁻¹	
ICP OES	---	Ca	19,2 ng g ⁻¹	[188]
		Mg	1,7 ng g ⁻¹	
		Na	107,6 ng g ⁻¹	
		K	16,3 ng g ⁻¹	
WCAES	---	Na	20 µg kg ⁻¹	[87]
		K	70 µg kg ⁻¹	

Após estabelecer as melhores condições instrumentais de determinação de Ca, Mg, Na e K por espectrometria atômica e também otimizar as variáveis envolvidas no procedimento de R-DLLME para amostras de biodiesel, a precisão e a exatidão de todo o procedimento experimental envolvido neste trabalho foram avaliadas utilizando um padrão organometálico B100 contendo 20,0 mg L⁻¹ de Ca-Mg-Na-K-P. Empregando o procedimento proposto baseado na R-DLLME, massas de 3,0000 g (\pm 0,0001 g) do padrão organometálico foram submetidas ao aquecimento em Banho Maria a 80 °C. Ao atingir a temperatura de 80 °C, foram adicionados 780 μ L da solução extratora composta por 5,0% (v/v) ácido nítrico:álcool isopropílico [3:1 (v/v)] ao padrão. A mistura padrão organometálico + solução extratora foi mantida sob aquecimento por mais 5 min. Em seguida a mistura foi submetida à agitação em *vórtex* por 30 s, banho de ultrassom aquecido a 45 °C por 3 min e, por fim, centrifugada a 3600 rpm por 15 min. Ao final deste procedimento, observou-se a formação da gota no fundo do tubo cônico. Toda solução sobrenadante foi removida e devidamente descartada, e a gota resultante foi adicionada água ultrapura até completar 5,0 mL de solução. A amostra resultante do procedimento de R-DLLME foi aspirada para o interior do nebulizador/queimador, e a absorbância obtida para cada analito foi interpolada na respectiva curva analítica. A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos para o teste de recuperação de Ca, Mg, Na e K no padrão organometálico de biodiesel B100.

Tabela 15. Recuperações obtidas para Ca, Mg, Na e K utilizando a R-DLLME como procedimento de preparo de amostra e determinação por F AAS e F AES.

Elemento	Valor certificado (mg L ⁻¹)	Valor determinado (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (%)
Ca	20,0	19,12 \pm 0,11	95,61	0,57
Mg	20,0	18,67 \pm 0,46	93,35	2,47
Na	20,0	19,31 \pm 1,04	96,56	5,36
K	20,0	18,32 \pm 0,09	91,61	0,50

Pode-se observar que os valores de recuperação variaram entre 91,61 - 96,56% com valores de RSD inferiores a 5,36%. Estes resultados demonstram que o procedimento de preparo de amostra empregando a R-DLLME apresenta boa precisão e exatidão, ao nível de 95% de confiança (teste-*t* de *Student*), e pode ser empregada como procedimento de preparo de amostras de biodiesel.

5.5 Determinação de Ca, Mg, Na e K em biodiesel

Diante dos resultados alcançados com o procedimento de preparo de amostra por R-DLLME, a metodologia desenvolvida foi aplicada para determinação de Ca, Mg, Na e K em amostras de biodiesel obtido a partir das espécies oleaginosas alternativas canola, crambe, girassol e pinhão-manso. Os teores dos elementos determinados estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16. Resultados (média \pm desvio padrão) da determinação ($n=3$) do teor de Ca, Mg, K e Na (mg kg^{-1}) em amostras de biodiesel utilizando o procedimento de preparo de amostra por R-DLLME.

Amostra	Ca	Mg	Na	K
Canola	$1,0147 \pm 0,0523$	$0,0576 \pm 0,0009$	$5,1645 \pm 0,1208$	$0,9080 \pm 0,0205$
Crambe	$1,1243 \pm 0,0173$	$0,0178 \pm 0,0008$	$0,4242 \pm 0,0228$	$0,1097 \pm 0,0010$
Girassol	$0,9171 \pm 0,0068$	$0,0187 \pm 0,0001$	$1,5654 \pm 0,1108$	$0,5275 \pm 0,0221$
Pinhão-manso	$1,4562 \pm 0,0337$	$0,0257 \pm 0,0001$	$9,5958 \pm 0,2963$	$2,6856 \pm 0,0519$

A faixa linear de trabalho permitiu a determinação dos analitos em todas as amostras de biodiesel submetidas ao procedimento de R-DLLME. Os teores dos elementos nos biodieseis variaram de $0,9171 \pm 0,0068$ - $1,4562 \pm 0,0337$ mg kg^{-1} Ca, $0,0178 \pm 0,0008$ - $0,0576 \pm 0,0009$ mg kg^{-1} Mg, $0,4242 \pm 0,0228$ - $9,5958 \pm 0,2963$ mg kg^{-1} Na e $0,1097 \pm 0,0010$ - $2,6856 \pm 0,0519$ mg kg^{-1} K. Os desvios padrão relativos (%RSD) obtidos para os elementos nas amostras de biodiesel variaram de 0,7439 - 5,1524% (Ca), 0,1212 - 4,6611% (Mg), 2,3383 - 7,0750% (Na) e 0,9227 - 4,1881% (K), indicando que a metodologia de determinação apresenta precisão satisfatória.

A soma das concentrações de Na e K nas amostras de canola e pinhão-manso foram 6,0725 e 12,2814 mg kg^{-1} , respectivamente. Estes valores estão acima do limite máximo estabelecido pela Resolução ANP 45/2014 [16] que é de 5,0 mg kg^{-1} . Provavelmente NaCl e Na₂SO₄ utilizados no processo de lavagem e secagem do biodiesel podem ter inserido Na⁺ nas amostras, bem como o KOH utilizado na reação de transesterificação, pode ter inserido K⁺. Já as demais amostras atenderam ao referido parâmetro de qualidade, no que diz respeito à concentração de Ca + Mg e Na + K. A elevada concentração desses analitos pode aumentar a formação de sedimentos e/ou sabões na câmara de combustão, além de promover falhas de injeção e entupimento de algumas partes dos motores [83].

Para fins comparativos, outros procedimentos de preparo de amostra baseados na diluição com xileno [16] e digestão em micro-ondas também foram avaliados. No

procedimento baseado na diluição da amostra com xileno [1:10 (v/v) e 1:5 (v/v) biodiesel:xileno], as diluições efetuadas não permitiram a determinação dos analitos nas amostras, uma vez que a concentração destes nas amostras diluídas ficaram abaixo do limite de detecção. Quando se empregou o procedimento de digestão em micro-ondas, a massa utilizada ($\approx 0,2500$ g) também não foi suficiente para proporcionar soluções amostras (25 mL) contendo concentração de Ca, Mg, Na e K acima dos limites de quantificação estabelecido para o método. Massas de 0,5000 g foram testadas, mas a devido à extrapolação da pressão interna acima do máximo permitido, a digestão não foi completa. Desta maneira, o procedimento de preparo de amostra proposto não foi comparado com nenhum outro procedimento devido aos inconvenientes observados.

Trabalhos relacionados com a determinação destes constituintes inorgânicos em espécies oleaginosas alternativas, seja em sementes, tecido vegetal, óleo vegetal e biodiesel, ainda são bastante incipientes. Mesmo assim, os resultados obtidos para as amostras de canola e girassol neste trabalho foram comparados com aqueles reportados em literatura (Tabela 17).

Tabela 17. Resultados comparativos para a determinação de Ca e Mg em amostras de biodiesel de canola e girassol.

Amostra	Elemento	Neste trabalho (mg kg ⁻¹)	Lyra <i>et al.</i> , 2010 (mg kg ⁻¹)	Ferreira <i>et al.</i> , 2015 (mg kg ⁻¹)
Canola	Ca	1,0147 ± 0,0523	1,42 ± 0,04	---
	Mg	0,0576 ± 0,0009	0,572 ± 0,004	---
Girassol	Ca	0,9171 ± 0,0068	0,63 ± 0,04	1,74 ± 0,14
	Mg	0,0187 ± 0,0001	---	---

Lyra *et al* (2010) [17] determinaram os teores de Ca e Mg em amostras de biodiesel de canola e girassol por F AAS e Ferreira *et al* (2015) [80] o teor de Ca em biodiesel de girassol por F AES utilizando os procedimentos de preparo de amostra baseados em microemulsão e compatibilização de matriz, respectivamente. Os valores apresentados na literatura específica são estatisticamente diferentes, ao nível de 95% de confiança (teste-*t* de *Student*), daqueles determinados neste trabalho. As diferenças observadas podem ser justificadas pelo fato destas espécies absorverem Ca e Mg do solo e da água em condições diferentes, ou seja, de acordo com a disponibilidade destes elementos nestes ambientes. Além disso, deve ser levado em consideração o processo de extração e purificação dos óleos vegetais [212], uma vez que sempre pode ocorrer a incorporação de diversas substâncias, incluindo os metais, nas amostras desde a obtenção da matéria-prima até o produto final.

6 CONCLUSÕES

Os testes iniciais (teor de umidade, índice de acidez, massa específica e viscosidade cinemática) realizados com as amostras de biodiesel demonstraram que somente os resultados obtidos para o teor de umidade ($300 - 400 \text{ mg kg}^{-1}$) não estão em conformidade com os valores máximo permitidos pela Portaria ANP 45/2014. Verificar as condições de temperatura interna da estufa antes de iniciar o teste pode resolver essa diferença. Além destes testes, a análise do material de partida (óleos vegetais) e produto final (biodiesel) em cromatografia de camada delgada permitiu visualizar a conversão dos triglicerídeos em ésteres metílicos.

O preparo de amostra baseado na microextração líquido-líquido dispersiva reversa utilizado na extração dos analitos em amostras de biodiesel caracterizou-se como sendo um procedimento, simples, rápido, não destrutivo e que permitiu a mínima manipulação das amostras, o que favoreceu na redução de possíveis contaminações da amostra. O procedimento proposto apresentou eficiência satisfatória, haja vista os valores obtidos de recuperação ($> 91\%$) para os analitos determinados.

A análise estatística multivariada aplicada ao procedimento de R-DLLME em amostras de biodiesel é uma ferramenta útil porque considera a influência das variáveis independentes e também as interações entre estas no sistema, e também porque permite reduzir a quantidade de experimentos durante a etapa de otimização dos parâmetros experimentais deste preparo de amostra.

Os parâmetros de confiabilidade analítica como sensibilidade, coeficientes de correlação linear, limites de detecção e de quantificação e desvios padrão relativos (%RSD) obtidos para a determinação de Ca, Mg, Na e K por espectrometria de absorção/emissão atômica em chama foram satisfatórios. Dessa forma, foi possível realizar a determinação dos analitos selecionados em amostras de biodiesel produzidas a partir de espécies oleaginosas alternativas utilizando a metodologia de preparo baseado na R-DLLME.

De acordo com os valores máximos estabelecidos pela Resolução ANP 45/2014, somente as amostras de canola e pinhão-manso apresentaram teor de Na+K superior a $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$.

7 REFERÊNCIAS

- [1] SATHRE, R. Comparing the heat of combustion of fossil fuels to the heat accumulated by their lifecycle greenhouse gases. **Fuel**, v. 115, p. 674-677, 2014.
- [2] MOHR, S.H.; WANG, J.; ELLEM, G.; WARD, J.; GIURCO, D. Projection of world fossil fuels by country. **Fuel**, v. 141, p. 120-135, 2015.
- [3] MILLER, C. A. Energy Resources and Policy: Vulnerability of Energy Resources and Resource Availability – Fossil Fuels (Oil, Coal, Natural Gas, Oil Shale). **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**, v.3, p. 37-51, 2013.
- [4] ZHONG, W.; AN, H.; FANG, W.; GAO, X.; DONG, D. Features and evolution of international fossil fuel trade network based on value of emergy. **Applied Energy**, v. 165, p. 868-877, 2016.
- [5] RAPOSO, J. D.; COSTA, L. M.; BARBEIRA, P. J. S. Simultaneous Determination of Na, K in Biodiesel by Flame Atomic Emission Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.26, p. 147-155, 2015.
- [6] EKENER-PETERSEN, E.; HÖGLUND, J.; FINNVEDEN, G. Screening potential social impacts of fossil fuels and biofuels for vehicles. **Energy Policy**, v. 73, p. 416-426, 2014.
- [7] XU, J.; JIANG, J.; ZHAO, J. Thermochemical conversion of triglycerides for production of drop-in liquid fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p.331-340, 2016.
- [8] GARCÍA-MARTOS, C.; RODRÍGUEZ, J.; SÁNCHEZ, M. J. Modelling and forecasting fossil fuels, CO₂ and electricity prices and their volatilities. **Applied Energy**, v.101, p. 363-375, 2013.
- [9] Conselho Empresarial Brasileiro para o Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: <<http://cebds.org/vamos-cumprir-nossas-metas/>>. Acesso em: 08 de Agosto de 2016.
- [10] WANG, R.; SUN, L.; XIE, X.; MA, L.; LIU, Z.; LIU, X.; JI, N.; XIE, G. Biodiesel production from *Stauntonia chinensis* seed oil (waste from food processing): Heterogeneous catalysis by modified calcite, biodiesel purification, and fuel properties. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 8-13, 2014.
- [11] LE, L. T.; IERLAND, E. C. V.; ZHU, X.; WESSELER, J.; NGO, G. Comparing the social costs of biofuels and fossil fuel: A case study of Vietnam. **Biomass and Bioenergy**, v. 54, p. 227-238, 2013.
- [12] HAMELINCK, C. N.; FAAIJ, A. P. C. Outlook for advanced biofuels. **Energy Policy**, v. 34, p. 3268-3283, 2006.
- [13] CHRISTOFF, P. **Produção de biodiesel a partir do óleo residual de fritura comercial. Estudo de caso: Guaratuba, Litoral Paranaense**. Curitiba - PR, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Tecnologia – LACTEC, 2006. Dissertação de Mestrado, 83 p.

- [14] TRZECIAK, M. B.; DAS NEVES, M. B.; VINHOLES, P. DA S.; VILLELA, F. A. Utilização de sementes de espécies oleaginosas para produção de biodiesel. **Informativo ABRATES**, v. 18, p. 30-38, 2008.
- [15] HOLANDA, A. **Biodiesel e inclusão social**. Brasília: Câmara de Deputados, Coordenação de Publicações, 2004, 200 p.
- [16] Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução nº 45, de 25 de agosto de 2014.
- [17] DE OLIVEIRA, L. C. C.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; BAPTISTA, P. M.; GONÇALVES, R. A.; DE CAMPOS, R. C. Determination of Na, K, Mg and Ca in Biodiesel by LS F AAS and HR-CS F AAS: Studies that Supported the Proposal of the ABNT NBR 15556 Norm. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1400-1408, 2012.
- [18] ARANDA, P. R.; GÁSQUEZ, J. A.; OLSINA, R. A.; MARTINEZ, L. D.; GIL, R. A. Method development for Cd and Hg determination in biodiesel by electrothermal atomic absorption spectrometry with emulsion sample introduction. **Talanta**, v. 101, p. 353-356, 2012.
- [19] LYRA, F. H.; CARNEIRO, M. T. W. D.; BRANDÃO, G. P.; PESSOA, H. M.; DE CASTRO, E. V. Determination of Na, K, Ca and Mg in biodiesel samples by flame atomic absorption spectrometry (F AAS) using microemulsion as sample preparation. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 180-185, 2010.
- [20] AMAIS, R. S.; GARCIA, E. E.; MONTEIRO, M. R.; NÓBREGA, J. A. Determination of Ca, Mg and Zn in biodiesel microemulsions by F AAS using discrete nebulization. **Fuel**, v. 93, p. 167-171, 2012.
- [21] SILVA, W. C.; CASTRO, M. P. P.; PEREZ, V. H.; MACHADO, F. A.; MOTA, L.; STHIEL, M. S. Thermal degradation of ethanolic biodiesel: Physicochemical and thermal properties evaluation. **Energy**, v. 114, p. 1093-1099, 2016.
- [22] SILVA, L. M. A.; ANDRADE, F. D.; FILHO, E. G. A.; MONTEIRO, M. R.; DE AZEVEDO, E. R.; VENÂNCIO, T. NMR investigation of commercial carbon black filled vulcanized natural rubber exposed to petrodiesel/biodiesel mixtures. **Fuel**, v. 186, p. 50-57, 2016.
- [23] BALSAMO N. F.; SAPAG, K.; OLIVA, M. I.; PECCHI, G. A.; EIMER, G. A.; CRIVELLO, M. E. Mixed oxides turned with alkaline metals to improve glycerolysis for sustainable biodiesel production. **Catalysis Today**, v. 279, p. 209-216, 2017.
- [24] NATIONAL BIODIESEL BOARD, USA. Chapter 2 – Introduction to Biodiesel and Glossary of Terms. **Bioenergy**, p. 37-40, 2015.
- [25] DE JESUS, A.; SILVA, M. M.; VALE, M. G. R. The use of microemulsion for determination of sodium and potassium in biodiesel by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 74, p. 1378-1384, 2008.
- [26] NALGUNDWAR, A.; PAUL, B.; SHARMA, S. K. Comparison of performance and emissions characteristics of DI CI engine fueled with dual biodiesel blends of palm and jatropha. **Fuel**, v. 173, p. 172-179, 2016.

- [27] ZHANG, D.; WEI, D.; DING, W.; ZHANG, X. Carbon-based nanostructured catalyst for biodiesel production by catalytic distillation. **Catalysis Communications**, v. 43, p. 121-125, 2014.
- [28] BASKAR, G.; AISWARYA, R. Trends in catalytic production of biodiesel from various feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 496-504, 2016.
- [29] VERMA, P.; SHARMA, M. P.; DWIVEDI, G. Prospects of bio-based alcohols for Karanja biodiesel production: An optimization study by Response Surface Methodology. **Fuel**, v. 183, p. 185-194, 2016.
- [30] LOBO, F. A.; GOVEIA, D.; OLIVEIRA, A. P.; ROMÃO, L. P. C.; FRACETO, L. F.; FILHO, N. L. D.; ROSA, A. H. Development of a method to determine Ni and Cd in biodiesel by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Fuel**, v. 90, p. 142-146, 2011.
- [31] NATIONAL BIODIESEL BOARD, USA. Chapter 35 – Biodiesel Emissions And Health Effects Testing. **Bioenergy**, p. 557-559, 2015.
- [32] CHAVES, E. S.; SAINT'PIERRE, T. D.; DOS SANTOS, E. J.; TORMEN, L.; BASCUÑAN, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Determination of Na and K in Biodiesel by Flame Atomic Emission Spectrometry and Microemulsion Sample Preparation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 856-861, 2008.
- [33] DHAMODARAN, G.; KRISHNAN, R.; POCHAREDDY, Y. K.; PYARELAL, H. M.; SIVASUBRAMANIAN, H.; GANESHRAM, A. K. A comparative study of combustion, emission, and performance characteristics of rice-bran-, neem-, and cottonseed-oil biodiesels with varying degree of unsaturation. **Fuel**, v. 187, p. 296-305, 2017.
- [34] ALVES, M. J.; CAVALCANTI, Í. V.; DE RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. Biodiesel dry purification with sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 119-127, 2016.
- [35] XUE, Y.; ZHAO, Z.; XU, G.; LIAN, X.; YANG, C.; ZHAO, W.; MA, P.; LIN, H.; HAN, S. Effect of poly-alpha-olefin pour point depressant on cold flow properties of waste cooking oil biodiesel blends. **Fuel**, v. 184, p. 110-117, 2016.
- [36] THANGARAJA, J.; ANAND, K.; MEHTA, P. S. Biodiesel NO_x penalty and control measures – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 1-24, 2016.
- [37] DEVI, A.; DAS, V. K.; DEKA, D. Ginger extract as a nature based robust additive and its influence on the oxidation stability of biodiesel synthesized from non-edible oil. **Fuel**, v. 187, p. 306-314, 2017.
- [38] CORACH, J.; SORICHETTI, P. A.; ROMANO, S. D. Permittivity of biodiesel-rich blends with fossil diesel fuel: Application to biodiesel content estimation. **Fuel**, v. 177, p. 268-273, 2016.
- [39] SHIMAMOTO, G. G.; TUBINO, M. Alternative methods to quantify biodiesel in standard diesel-biodiesel blends and samples adulterated with vegetable oil through UV-Visible spectroscopy. **Fuel**, v. 186, p. 199-203, 2016.

- [40] BRASIL. Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016. Dispõe sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional.
- [41] ISSARIYAKUL, T.; DALAI, A. K. Biodiesel from vegetable oils. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 446-471, 2014.
- [42] DEMIRBAS, A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. **Energy Conversion and Management**, v. 49, p. 125-130, 2008.
- [43] RATTANAPOLTEE, P.; KAEWKANNETRA, P. Cultivation of microalga, *Chlorella vulgaris* under different auto-hetero-mixotrophic growths as a raw material during biodiesel production and cost evaluation. **Energy**, v. 78, p. 4-8, 2014.
- [44] CHAVES, E. S.; DOS SANTOS, E. J.; ARAUJO, R. G. O.; OLIVEIRA, J. V.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Metals and phosphorus determination in vegetable seeds used in the production of biodiesel by ICP OES and ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 71-76, 2010.
- [45] DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 14-34, 2009.
- [46] MACEIRAS, R.; RODRÍGUEZ, M.; CANCELA, A.; URRÉJOLA, S.; SÁNCHEZ, A. Macroalgae: Raw material for biodiesel production. **Applied Energy**, v. 88, p. 3318-3323, 2011.
- [47] DIAS, J. M.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M.; ALMEIDA, M. F.; DÍAZ, J. D. M.; POLO, M. S.; UTRILLA, J. R. Biodiesel production using calcium manganese oxide as catalyst and different raw materials. **Energy Conversion and Management**, v. 65, p. 647-653, 2013.
- [48] RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 261-268, 2009.
- [49] ELAHI, N.; DUNCAN, R. W.; STASOLLA, C. Modification of oil and glucosinolate content in canola seeds with altered expression of *Brassica napus* LEAFY COTYLEDON1. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 52-63, 2016.
- [50] Indicativos tecnológicos para produção de canola no RS. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/p_sp03_2007.pdf>. Acesso em: 15 de março de 2016.
- [51] RAMBABU, N.; RAO, B. V. S. K.; SURISSETTY, V. R.; DAS, U.; DALAI, A. K. Production, characterization, and evaluation of activated carbons from de-oiled canola meal for environmental applications. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 572-581, 2015.
- [52] Canola: uma variação genética mundialmente apreciada. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/224.pdf>>. Acesso em: 15 de março de 2016.
- [53] SOMIDI, A. K. R.; DAS, U.; DALAI, A. K. One-pot synthesis of canola oil based biolubricants catalyzed by MoO₃/Al₂O₃ and process optimization study. **Chemical Engineering Journal**, v. 293, p. 259-272, 2016.

- [54] SELANI, M. M.; SHIRADO, G. A. N.; MARGIOTTA, G. B.; RASERA, M. L.; MARABESI, A. C.; PIEDADE, S. M. S.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Pineapple by-product and canola oil as partial fat replacers in low-fat beef burger: Effects on oxidative stability, cholesterol content and fatty acid profile. **Meat Science**, v. 115, p. 9-15, 2016.
- [55] ÍTAVO, L. C. V.; DE SOUZA, A. D. V.; FÁVARO, S. P.; ÍTAVO, C. C. B. F.; PETIT, H. V.; DIAS, A. M.; MORAIS, M. G.; COELHO, R. G.; REIS, F. A.; COSTA, J. A. A.; ROSCOE, R. Intake, digestibility, performance, carcass characteristics and meat quality of lambs fed different levels of crambe meal in the diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 40-48, 2016.
- [56] WAZILEWSKI, W. T.; BARICCATTI, R. A.; MARTINS, G. I.; SECCO, D.; DE SOUZA, S. N. M.; ROSA, H. A.; CHAVES, L. I. Study of the methyl crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) and soybean biodiesel oxidative stability. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 207-212, 2013.
- [57] SANTOS, K. A.; BARICCATTI, R. A.; CARDOZO-FILHO, L.; SCHNEIDER, R.; PALÚ, F.; DA SILVA, C.; DA SILVA, E. A. Extraction of crambe seed oil using subcritical propane: Kinetics, characterization and modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 104, p. 54-61, 2015.
- [58] LARA-FIOREZE, A. C. C.; TOMAZ, C. A.; FIOREZE, S. L.; PILON, C.; ZANOTTO, M. D. Genetic diversity among progenies of *Crambe abyssinica* Hochst for seed traits. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 771-775, 2013.
- [59] NO, D. A.; ZHAO, T. T.; KIM, B. H.; CHOI, H. KIM, I. Enrichment of erucic acid from crambe oil in a recirculated packed bed reactor via lipase-catalyzed ethanolysis. **Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 6-10, 2013.
- [60] ROGÉRIO, F.; DA SILVA, T. R. B.; DOS SANTOS, J. I.; POLETINE, J. P. Phosphorus fertilization influences grain yield and oil content in crambe. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 266-268, 2013.
- [61] PITOL, C.; BROCH, D. L.; ROSCOE, R. **Tecnologia e Produção: Crambe**. 1ª ed. Maracaju: Fundação MS, 2010, 60 p.
- [62] HACIOGLU, B. T. Molecular diversity of the wild *Crambe* (Brassicaceae) taxa in Turkey detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 214-219, 2016.
- [63] DOS SANTOS, J. I.; DA SILVA, T. R. B.; ROGÉRIO, F.; SANTOS, R. F.; SECCO, D. Yield response in crambe to potassium fertilizer. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 297-300, 2013.
- [64] DA SILVA, T. R. B.; REIS, A. C. de S.; MACIEL, C. D. de G. Relationship between chlorophyll meter readings and total N in crambe leaves as affected by nitrogen topdressing. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 135-138, 2012.
- [65] CHHIKARA, S.; DUTTA, I.; PAULOSE, B.; JAIWAL, P. K.; DHANKHER, O. P. Development of an *Agrobacterium*-mediated stable transformation method for industrial

oilseed crop *Crambe abyssinica* 'BelAnn'. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 457-465, 2012.

[66] CASTRO, C. de.; CASTIGLIONI, V. B. R.; BALLA, A.; LEITE, R. M. V. B. de C.; KARAM, D.; MELLO, H. C.; GUEDES, L. C. A.; FARIAS, J. R. B. **A cultura do girassol**. 1ª ed. Londrina, EMBRAPA-CNPSo, 1996, 38 p.

[67] A cultura do girassol. Disponível em: <<http://www2.esalq.usp.br/departamentos/lpv/lpv506/LPV-0506%20-%20GIRASSOL%20APOSTILO%202012.pdf>>. Acesso em: 22 de março de 2016.

[68] FRITSCH, C.; HEINRICH, V.; VOGEL, R. F.; TOELSTEDTE, S. Phenolic acid degradation potential and growth behavior of lactic acid bacteria in sunflower substrates. **Food Microbiology**, v. 57, p. 178-186, 2016.

[69] Girassol. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/girassol>>. Acesso em: 22 de março de 2016.

[70] LIRA, M. A.; CARVALHO, H. W. L. de.; CHAGAS, M. C. M. das.; BRISTOT, G.; DANTAS, J. A.; LIMA, J. M. P. de. **Avaliação das potencialidades da cultura do girassol, como alternativa de cultivo no semiárido nordestino**. 1ª ed. Natal: EMPARN, 2011, 40 p.

[71] Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel. Disponível em: http://www.ubrario.com.br/1891/textos/programanacionaldeproducaodebiodiesel_29608/>. Acesso em: 24 de março de 2016.

[72] KUMAR, P.; SRIVASTAVA, V. C.; JHA, M. K. *Jatropha curcas* phytotomy and applications: Development as a potential biofuel plant through biotechnological advancements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 818-838, 2016.

[73] RODRIGUES, J.; MIRANDA, I.; GOMINHO, J.; VASCONCELOS, M.; BARRADAS, G.; PEREIRA, H.; BIANCHI-DE-AGUIAR, F.; FERREIRA-DIAS, S. Modeling and optimization of laboratory-scale conditioning of *Jatropha curcas* L. seeds for oil expression. **Industrial Crops and Products**, v.83, p. 614-619, 2016.

[74] ZHANG, X.; YANG, Z.; LIANG, J.; TANG, L.; CHEN, F. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake in solid-state fermentation of newly isolated endophytic strain and nutrition assessment for its potential utilizations. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 109, p. 202-210, 2016.

[75] MELONI, D.; PERRA, D.; MONACI, R.; CUTRUFELLO, M. G.; ROMBI, E.; FERINO, I. Transesterification of *Jatropha curcas* oil and soybean oil on Al-SBA-15 catalysts. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 184, p. 163-173, 2016.

[76] NARESH, B.; REDDY, M. S.; VIJAYALAKSHMI, P.; REDDY, V.; DEVI, P. Physico-chemical screening of accessions of *Jatropha curcas* for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 40, p. 155-161, 2012.

[77] LIM, B. Y.; SHAMSUDIN, R.; BAHARUDIN, B. T. H. T.; YUNUS, R. Performance evaluation and cfd multiphase modeling for Multistage *Jatropha* Fruit Shelling Machine. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 125-138, 2016.

- [78] MUDALKAR, S.; SREEHARSHA, R. V.; REDDY, A. R. A novel aldo-keto reductase from *Jatropha curcas* L. (JcAKR) plays a crucial role in the detoxification of methylglyoxal, a potent electrophile. **Journal of Plant Physiology**, v. 195, p. 39-49, 2016.
- [79] LAVIOLA, B. G.; DIAS, L. A. dos S. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de pinhão manso. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p. 1969-1975, 2008.
- [80] FERREIRA, C. C.; COSTA, L. M.; BARBEIRA, P. J. S. Methyl oleate as matrix simulacrum for the simultaneous determination of metals in biodiesel samples by flame atomic emission spectroscopy. **Talanta**, v. 138, p. 8-14, 2015.
- [81] KORN, M. G. A.; SANTOS, D. C. M. B.; GUIDA, M. A. B.; BARBOSA, I. S.; PASSOS, M. L. C.; SARAIVA, M. L. M. F. S.; LIMA, J. L. F. C. Evaluation of Digestion Procedures for Simultaneous Determination of Ca, P, Mg, K and Na in Biodiesel by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 2278-2284, 2010.
- [82] SQUISSATO, A. L.; LIMA, A. F.; ALMEIDA, E. S.; PASQUINI, D.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Eucalyptus pulp as an adsorbent for metal removal from biodiesel. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 1-5, 2017.
- [83] PEREIRA, F. M.; BRUM, D. M.; LEPRI, F. G.; CASSELLA, R. J. Extraction induced by emulsion breaking as a tool for Ca and Mg determination in biodiesel by fast sequential flame atomic absorption spectrometry (FS-FAAS) using Co as internal standard. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 172-177, 2014.
- [84] SHISHOV, A. Y.; NIKOLAEVA, L. S.; MOSKVIN, L. N.; BULATOV, A. V. Full automated spectrophotometric procedure for simultaneous determination of calcium and magnesium in biodiesel. **Talanta**, v. 135, p. 133-137, 2015.
- [85] ALMEIDA, J. M. S.; DORNELLAS, R. M.; YOTSUMOTO-NETO, S.; GHISI, M. FURTADO, J. G. C.; MARQUES, E. P.; AUCÉLIO, R. Q.; MARQUES, A. L. B. A simple electroanalytical procedure for the determination of calcium in biodiesel. **Fuel**, v. 115, p. 658-665, 2014.
- [86] LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. da. Biodiesel: Parâmetros de Qualidade e Métodos Analíticos. **Química Nova**, v. 32, p. 1596-1608, 2009.
- [87] DANCSAK, S. E.; SILVA, S. G.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Direct determination of sodium, potassium, chromium and vanadium in biodiesel fuel by tungsten coil atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 806, p. 85-90, 2014.
- [88] MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 35-41, 2012.
- [89] KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Piracicaba: F. J. Krug, 2008, 340 p.
- [90] OLIZ, C. M.; LOPES, E. R.; MEDINA, A. L.; RIBEIRO, A. S.; NUNES, A. M. Determinação de metais por técnicas de espectrometria atômica em amostras de carvão

mineral e cinzas utilizando metodologia de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 39, p. 936-943, 2016.

[91] MELO, L. C. A.; SILVA, C. A. Influência de Métodos de Digestão e Massa de Amostra na Recuperação de Nutrientes em Resíduos Orgânicos. **Química Nova**, v. 31, p. 556-561, 2008.

[92] KNAPP, G. Mechanized Techniques for Sample Decomposition and Element Preconcentration. **Mikrochimica Acta**, v. 2, p. 445-455, 1991.

[93] PEREIRA, J. S. F.; MORAES, D. P.; ANTES, F. G.; DIEHL, L. O.; SANTOS, M. F. P.; GUIMARÃES, R. C. L.; FONSECA, T. C. O.; DRESSLER, V. L.; FLORES, É. M. M. Determination of metals and metalloids in light and heavy crude oil by ICP-MS after digestion by microwave-induced combustion. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 4-11, 2010.

[94] PEREIRA, L. S. F.; IOP, G. D.; FLORES, E. M. M.; BURROW, R. A.; MELLO, P. A.; DUARTE, F. A. Strategies for the determination of trace and toxic elements in pitch: Evaluation of combustion and wet digestion methods for sample preparation. **Fuel**, v. 163, p. 175-179, 2016.

[95] CRUZ, S. M.; SCHMIDT, L.; NORA, F. M. D.; PEDROTTI, M. F.; BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; FLORES, M. M. Microwave-induced combustion method for the determination of trace and ultratrace element impurities in graphite samples by ICP-OES and ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 28-32, 2015.

[96] LÓPEZ-GARCÍA, I.; VICENTE-MARTÍNEZ, Y.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of cadmium and lead in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry after reverse dispersive liquid-liquid microextraction. **Talanta**, v. 124, p. 106-110, 2014.

[97] LÓPEZ-GARCÍA, I.; BRICEÑO, M.; VICENTE-MARTÍNEZ, Y.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Rapid screening of water soluble arsenic species in edible oils using dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 167, p. 396-401, 2015.

[98] OLIVEIRA, E. de. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 174-182, 2003.

[99] DE JESUS, A. **Desenvolvimento de método analítico para determinação de metais em biodiesel e óleo vegetal por espectrometria de absorção atômica com chama**. Porto Alegre - RS, Programa de Pós-Graduação em Química – UFRS, 2008. Dissertação de Mestrado, 65 p.

[100] BAKIRCIOGLU, D.; KURTULUS, Y. B.; YURTSEVER, S. Comparison of extraction induced by emulsion breaking, ultrasonic extraction and wet digestion procedures for determination of metals in edible oil samples in Turkey using ICP-OES. **Food Chemistry**, v. 138, p. 770-775, 2013.

[101] BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. Pretreatment of oily samples for analysis by flow injection-spectrometric methods. **Talanta**, v. 83, p. 691-699, 2011.

- [102] KNOCHEN, M.; SIXTO, A.; PIGNALOSA, G.; DOMENECH, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Determination of insolubles in diesel lubricating oil by FIA-visible spectrometry. **Talanta**, v. 64, p. 1359-1363, 2004.
- [103] MESA, J. A. G.; LINARES, P.; DE CASTRO, M. D. L.; VALCÁRCEL, M. Direct automatic determination of polyphenols in olive oils in the aqueous phase of a flow-injection liquid-liquid extraction system without phase separation. **Analytica Chimica Acta**, v. 235, p. 441-444, 1990.
- [104] CAÑIZARES, M. P.; TENA, M. T.; DE CASTRO, M. D. L. On line coupling of a liquid-liquid extraction flow-reversal system to a spectrophotometric flow-through sensor for the determination of polyphenols in olive oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 323, p. 55-62, 1996.
- [105] REIS, B. F.; KNOCHEN, M.; PIGNALOSA, G.; CABRERA, N.; GIGLIO, J. A. A multicommuted flow system for the determination of copper, chromium, iron and lead in lubricating oils with detection by flame AAS. **Talanta**, v. 64, p. 1220-12225, 2004.
- [106] CHAVES, E. S.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. de; CURTIUS, A. J.; VANHAECKE, F. Determination of trace elements in biodiesel and vegetable oil inductively coupled plasma optical emission spectrometry following alcohol dilution. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 66, p. 733-739, 2011.
- [107] BARROS, A. I.; OLIVEIRA, A. P. de; MAGALHÃES, M. R. L. de; VILLA, R. D. Determination of sodium and potassium in biodiesel by flame atomic emission spectrometry, with dissolution in ethanol as a single sample preparation step. **Fuel**, v. 93, p. 381-384, 2012.
- [108] SAINT'PIERRE, T. D.; DIAS, L. F.; POZEBON, D.; AUCÉLIO, R. Q.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B. Determination of Cu, Mn, Ni and Sn in gasoline by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry and emulsion sample introduction. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, p. 1991-2001, 2002.
- [109] PEREIRA, F. M.; ZIMPECK, R. C.; BRUM, D. M.; CASSELLA, R. J. Novel extraction induced by emulsion breaking as a tool for the determination of trace concentrations of Cu, Mn and Ni in biodiesel by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 117, p. 32-38, 2013.
- [110] SILVA, J. S. A.; CHAVES, E. S.; SANTOS, É. J. dos.; SAINT'PIERRE, T. D.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Calibration Techniques and Modifiers for the Determination of Cd, Pb and Tl in Biodiesel as Microemulsion by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 620-626, 2010.
- [111] OLIVEIRA, A. R. M. de; MAGALHÃES, I. R. dos S.; SANTANA, J. M. de; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 637-644, 2008.
- [112] MOREIRA, B. J.; YOKOYA, J. M. C.; GALTANI, C. M. de. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p. 186-204, 2014.

- [113] CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p. 1604-1617, 2011.
- [114] AL-SAIDI, H. M.; EMARA, A. A. A. The recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of inorganic analytes. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 745-761, 2014.
- [115] ASADI, M.; DADFARNIA, S.; SHABANI, A. M. H. Simultaneous extraction and determination of albendazole and triclabendazole by a novel syringe to syringe dispersive liquid phase microextraction-solidified floating organic drop combined with high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 932, p. 22-28, 2016.
- [116] POUYAN, M.; BAGHERIAN, G.; GOUDARZI, N. Determination of ultra-trace palladium (II) in water, soil and food samples by dispersive liquid-liquid microextraction-atomic absorption spectrometry using 2-mercaptobenzimidazole as a complexing agent. **Microchemical Journal**, v. 127, p. 46-51, 2016.
- [117] DE LA CALLE, I.; PENA-PEREIRA, F.; CABALEIRO, N.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Ion pair-based dispersive liquid-liquid microextraction for gold determination at ppb level in solid samples after ultrasound-assisted extraction and in waters by electrothermal-atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 84, p. 109-115, 2011.
- [118] SHAMSIPUR, M.; RAMEZANI, M. Selective determination of ultra-trace amounts of gold by graphite furnace atomic absorption spectrometry after dispersive liquid-liquid microextraction. **Talanta**, v. 75, p. 294-300, 2008.
- [119] BERIJANI, S.; ASSADI, Y.; ANBIA, M.; HOSSEINI, M. M.; AGHAEE, E. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal of Chromatography**, v. 1123, p. 1-9, 2006.
- [120] NASERI, M. T.; HOSSEINI, M. M.; ASSADI, Y.; KIANI, A. Rapid determination of lead in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 75, p. 56-62, 2008.
- [121] NAJAFI, N. M.; TAVAKOLI, H.; ALIZADEH, R.; SEIDI, S. Speciation and determination of ultra-trace amounts of inorganic tellurium in environmental water samples by dispersive liquid-liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 670, p. 18-23, 2010.
- [122] CHENG, J.; ZHOU, Y.; ZUO, M.; DAI, L.; GUO, X. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of two fungicides in environmental water samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 90, p. 845-855, 2010.
- [123] REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. M.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1-9, 2006.

- [124] CORTADA, C.; VIDAL, L.; PASTOR, R.; SANTIAGO, N.; CANALS, A. Determination of organochlorine pesticides in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, p. 218-221, 2009.
- [125] TSAI, W.; HUANG, S. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography for the determination of chlorophenoxy acid herbicides in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7846-7850, 2009.
- [126] MELWANKI, M. B.; FUH, M. Partitioned dispersive liquid-liquid microextraction an approach for polar organic compounds extraction from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1207, p. 24-28, 2008.
- [127] OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S.; PAVÓN, J. M. C. Determination of Cobalt in Food, Environmental and Water Samples with Preconcentration by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 125-130, 2012.
- [128] MAHMOUD, C.; MOHADESE, H.; HOSSEIN, A. M.; ABOLFAZL, D. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop Combined with Flame Atomic Absorption Spectrometry for Preconcentration and Determination of Thallium(III) in Water Samples. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 33, p. 59-66, 2014.
- [129] CHEN, S.; SUN, Y.; CHAO, J.; CHENG, L.; CHEN, Y.; LIU, J. Dispersive liquid-liquid microextraction of silver nanoparticles in water using ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. **Journal of Environmental Sciences**, v. 41, p. 211-217, 2014.
- [130] SEEGER, T. S.; ROSA, F. C.; BIZZI, C. A.; DRESSLER, V. L.; FLORES, M. M. E.; DUARTE, F. A. Feasibility of dispersive liquid-liquid microextraction for extraction and preconcentration of Cu and Fe in red and white wine and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 105, p. 136-140, 2015.
- [131] LAI, G.; CHEN, G.; CHEN, T. Speciation of As^{III} and As^V in fruit juices by dispersive liquid-liquid microextraction and hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. **Food Chemistry**, v. 190, p. 158-163, 2016.
- [132] ROSA, F. C.; DUARTE, F. A.; PANIZ, J. N. G.; HEIDRICH, G. M.; NUNES, M. A. G.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Dispersive liquid-liquid microextraction: an efficient approach for the extraction of Cd and Pb from honey and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 211-217, 2015.
- [133] MANDLATE, J. S.; SOARES, B. M.; SEEGER, T. S.; VECCHIA, P. D.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M.; DUARTE, F. A. Determination of cadmium and lead at sub-ppt level in soft drinks: An efficient combination between dispersive liquid-liquid microextraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 221, p. 907-912, 2017.
- [134] AHMAD, W.; BASHAMMAKH, A. S.; AL-SIBAAI, A. A.; ALWAEL, H.; EL-SHAHAWI, M. S. Trace determination of Cr(III) and Cr(VI) species in water samples via dispersive liquid-liquid microextraction and microvolume UV-Vis spectrometry. Thermodynamics, speciation study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 224, p. 1242-1248, 2016.

- [135] EZODDIN, M.; MAJIDI, B.; ABDI, K. Ultrasound-assisted supramolecular dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drops for preconcentration of palladium in water and road dust samples. **Journal of Molecular Liquids**, v. 209, p. 515-519, 2015.
- [136] LI, Y.; PENG, G.; HE, Q.; ZHU, H.; AL-HAMADANI, S. M. Z. F. Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop followed by ICP-MS for the simultaneous determination of heavy metals in wastewaters. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 140, p. 156-161, 2015.
- [137] DASBASI, T.; SAÇMACI, S.; ÜLGEN, A.; KARTAL, S. A simple dispersive liquid-liquid microextraction method for determination of Ag(I) by flame atomic absorption spectrometry, **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 28, p. 316-321, 2015.
- [138] MENG, L.; WANG, B.; LUO, F.; SHEN, G.; WANG, Z.; GUO, M. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and CE with UV detection for the chiral separation and determination of the multiple illicit drugs on forensic samples. **Forensic Science International**, v. 209, p. 42-47, 2011.
- [139] FARAHANI, H.; NOROUZI, P.; DINARVAND, R.; GANJALI, M. R. Development of dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, p. 105-112, 2007.
- [140] EL-SHAHAWI, M. S.; AL-SAIDI, H. M. Dispersive liquid-liquid microextraction for chemical speciation and determination of ultra-trace concentrations of metal ions. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 44, p. 12-24, 2013.
- [141] AKHOND, M.; ABSALAN, G.; POURSHAMSI, T.; RAMEZANI, A. M. Gas-assisted dispersive liquid-phase microextraction using ionic liquid as extracting solvent for spectrophotometric speciation of copper. **Talanta**, v. 154, p. 461-466, 2016.
- [142] MAYA, F.; HORSTKOTTE, B.; ESTELA, J. M.; CERDA, V. Automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 1-8, 2014.
- [143] FARAJZADEH, M. A.; YADEGHARI, A.; KHOSH MARAM, L. Combination of dispersive solid phase extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for extraction of so aryloxy pesticides prior to their determination by gas chromatography. **Microchemical Journal**, v. 131, p. 182-191, 2017.
- [144] FARAJZADEH, M. A.; MOGADDAM, M. R. A.; AGHDAM, S. R.; NOURI, N.; BAMORROWAT, M. Application of elevated temperature-dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organophosphorous pesticides residues in aqueous samples followed by gas chromatography-flame ionization detection. **Food Chemistry**, v. 212, p. 198-204, 2016.
- [145] WANG, X.; SHU, B.; LI, S.; YANG, Z.; QIU, B. QuEChERS followed by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for organochlorine pesticides analysis in fish. **Talanta**, v. 162, p. 90-97, 2017.

- [146] CELANO, R.; PICCINELLI, A. L.; CAMPONE, L.; RASTRELLI, L. Ultra-preconcentration and determination of selected pharmaceutical and personal care products in different water matrices by solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction prior to ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1355, p. 26-35, 2014.
- [147] HUANG, P.; ZHAO, P.; DAI, X.; HOU, X.; ZHAO, L. Trace determination of antibacterial pharmaceuticals in fishes by microwave-assisted extraction and solid-phase purification combined with dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1011, p. 136-144, 2016.
- [148] VÁSQUEZ, M. M. P.; VÁSQUEZ, P. P.; GALERA, M. M.; GARCÍA, M. D. G.; UCLÉS, A. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry for simultaneous analysis of pharmaceuticals in wastewaters. **Journal of Chromatography A**, v. 1291, p. 19-26, 2013.
- [149] MIEKUS, N.; OLEDZKA, I.; PLENIS, A.; KOWALSKI, P.; BIEN, E.; MIEKUS, A.; KRAWCZYK, M. A.; DROZYNSKA, E. A.; BACZEK, T. Determination of urinary biogenic amines biomarker profile in neuroblastoma and pheochromocytoma patients by MEKC method with preceding dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography B**, v. 1036-1037, p. 114-123, 2016.
- [150] PLOTKA-WASYLKA, J.; SIMEONOV, V.; NAMIESNIK, J. An *in situ* derivatization – dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas-chromatography-mass spectrometry for determining biogenic amines in home-made fermented alcoholic drinks. **Journal of Chromatography A**, v. 1453, p. 10-18, 2016.
- [151] AEENEHVAND, S.; TOUDEHROUSTA, Z.; KAMANKESH, M.; MASHAYEKH, M.; TAVAKOLI, H. R.; MOHAMMADI, A. Evaluation and application of microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for the determination of polar heterocyclic aromatic amines in hamburger patties. **Food Chemistry**, v. 190, p. 429-453, 2016.
- [152] LAVILLA, I.; GIL, S.; COSTAS, M.; BENDICHO, C. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with microvolume spectrophotometry to turn green the 5530 APHA standard method for determining phenols in water and wastewater. **Talanta**, v. 98, p. 197-202, 2012.
- [153] VERA-AVILA, L. E.; ROJO-PORTILLO, T.; COVARRUBIAS-HERRERA, R.; PEÑA-ALVAREZ, A. Capabilities and limitations of dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic drop for the extraction of organic pollutants from water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 805, p. 60-69, 2013.
- [154] ROCHA, B. A.; DA COSTA, B. R. B.; DE ALBUQUERQUE, N. C. P.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; SOUZA, J. M. O.; AL-TAMEEMI, M.; CAMPIGLIA, A. D.; BARBOSA JR, F. A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 154, p. 511-519, 2016.

- [155] ARAIN, S. A.; KAZI, T. G.; AFRIDI, H. I.; ARAIN, M. S.; PANHWAR, A. H.; KHAN, N.; BAIG, J. A.; SHAH, F. A new dispersive liquid-liquid microextraction using ionic liquid based microemulsion coupled with cloud point extraction for determination of copper in serum and water samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 186-192, 2016.
- [156] LIU, Y.; HE, M.; CHEN, B.; HU, B. Ultra-trace determination of gold nanoparticles in environmental water by surfactant assisted dispersive liquid liquid microextraction coupled with electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 122, p. 94-102, 2016.
- [157] SHIRKHANLOO, H.; GHAZAGHI, M.; MOUSAVI, H. Z. Cadmium determination in human biological samples based on trioctylmethyl ammonium thiosalicylate as a task-specific ionic liquid by dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Molecular Liquids**, v. 218, p. 478-483, 2016.
- [158] MOHAMMADI, S. Z.; BAGHELANI, Y. M.; MANSORI, F.; SHAMSPUR, T.; AFZALI, D. Dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous separation of trace amount of zinc and cadmium ions in water samples prior to flame atomic absorption spectrometry determination. **Química Nova**, v. 35, p. 198-202, 2012.
- [159] FERNÁNDEZ, E.; VIDAL, L.; COSTA-GRACÍA, A.; CANALS, A. Mercury determination in urine samples by gold nanostructured screen-printed carbon electrodes after vortex-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 915, p. 49-55, 2016.
- [160] SHAMSIPUR, M.; FATTAHI, N.; ASSADI, Y.; SADEGHI, M.; SHARAFI, K. Speciation of As(III) and As(V) in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after solid phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop. **Talanta**, v. 130, p. 26-32, 2014.
- [161] KARADAS, C.; KARA, D. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for preconcentration and determination of trace amounts of copper by flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 220, p. 242-248, 2017.
- [162] SHIRKHANLOO, H.; GHAZAGHI, M.; ESKANDARI, M. M. Cloud point assisted dispersive ionic liquid-liquid microextraction for chromium speciation in human blood samples based on isopropyl 2-[(isopropoxycarbothioly)disulfanyl] ethane thioate. **Analytical Chemistry Research**, v. 10, p. 18-27, 2016.
- [163] MEIRA, L. A.; DIAS, F. DE S. Application of constrained mixture design and Doehlert matrix in the optimization of dispersive liquid-liquid microextraction assisted by ultrasound for preconcentration and determination of cadmium in sediment and water samples by FAAS. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 56-63, 2017.
- [164] TUZEN, M.; PEKINER, O. Z. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometric for selenium speciation in foods and beverages. **Food Chemistry**, v. 188, p. 619-624, 2015.

- [165] LIU, Y.; HE, M.; CHEN, B.; HU, B. Simultaneous speciation of inorganic arsenic, selenium and tellurium in environmental water samples by dispersive liquid liquid microextraction combined with electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, v. 142, p. 213-220, 2015.
- [166] PENG, B.; SHEN, Y.; GAO, Z.; ZHOU, M.; MA, Y.; ZHAO, S. Determination of total iron in water and foods by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with microvolume UV-vis spectrophotometry. **Food Chemistry**, v. 176, p. 288-293, 2015.
- [167] FERNÁNDEZ, E.; VIDAL, L.; MARTÍN-YERGA, D.; BLANCO, M. DEL C.; CANALS, A.; COSTA-GARCÍA, A. Screen-printed electrode based electrochemical detector coupled with ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and microvolume back-extraction for determination of mercury in water samples. **Talanta**, v. 135, p. 34-40, 2015.
- [168] AL-SAIDI, H. M.; ABDEL-FADEEL, M. A.; EL-SONBATI, A. Z.; EL-BINDARY, A. A. Determination of bismuth in different samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with microvolume β -correction spectrophotometry. **Journal of Molecular Liquids**, v. 212, p. 635-640, 2015.
- [169] AGUIRRE, M. A.; SELVA, E. J.; HIDALGO, M.; CANALS, A. Dispersive liquid-liquid microextraction for metals enrichment: A useful strategy for improving sensitivity of laser-induced breakdown spectroscopy in liquid samples analysis. **Talanta**, v. 131, p. 348-353, 2015.
- [170] ÖZDEMİR, C.; SAÇMACI, S.; KARTAL, S.; SAÇMACI, M. Determination of gold and palladium in environmental samples by FAAS after dispersive liquid-liquid microextraction pretreatment. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, p. 4059-4065, 2014.
- [171] SHRIVAS, K.; JAISWAL, N. K. Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of copper in cereals and vegetable food samples using flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2263-2268, 2013.
- [172] DE BOECK, M.; MISSOTTEN, S.; DEHAEN, W.; TYTGAT, J.; CUYPERS, E. Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction procedure combined with LC-MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in whole blood. **Forensic Science International**, In Press, Corrected Proof.
- [173] LEONG, M.; FUH, M.; HUANG, S. Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1335, p. 2-14, 2014.
- [174] SEEBUNRUENG, K.; SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SRIJARANAI, S. Vortex-assisted low density solvent based demulsified dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water samples. **Chemosphere**, v. 103, p. 51-58, 2014.
- [175] FARAJZADEH, M. A.; NOURI, N. Simultaneous derivatization and air-assisted liquid-liquid microextraction of some aliphatic amines in different aqueous samples followed by gas chromatography-flame ionization detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 775, p. 50-57, 2013.

- [176] RAHMANI, M.; GHASEMI, E.; SASANI, M. Application of response surface methodology for air assisted-dispersive liquid-liquid microextraction of deoxynivalenol in rice samples prior to HPLC-DAD analysis and comparison with solid phase extraction cleanup. **Talanta**, v. 165, p. 27-32, 2017.
- [177] SRICHAROEN, P.; LIMCHOOWONG, N.; TECHAWONGSTIEN, S.; CHANTHAI, S. A novel extraction method for β -carotene and other carotenoids in fruit juices using air-assisted, low-density solvent-based liquid-liquid microextraction and solidified floating organic droplets. **Food Chemistry**, v. 203, p. 386-393, 2016.
- [178] MARTINIS, E. M.; WUILLOUD, R. G. Enhanced spectrophotometric detection of Hg in water samples by surface plasmon resonance of Au nanoparticles after preconcentration with vortex-assisted liquid-liquid microextraction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 167, p. 111-115, 2016.
- [179] ZARUBA, S.; VISHNIKIN, A. B.; ANDRUCH, V. A novel vortex-assisted liquid-liquid microextraction approach using auxiliary solvent: Determination of iodide in mineral water samples. **Talanta**, v. 149, p. 110-116, 2016.
- [180] WEI, S.; LEONG, M.; LI, Y.; HUANG, S. Development of liquid phase microextraction based on manual shaking and ultrasound-assisted emulsification method for analysis of organochlorine pesticides in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 9142-9248, 2011.
- [181] KORN, M. DAS G. A.; DOS SANTOS, D. S. S.; WELZ, B.; VALE, M. G. R.; TEIXEIRA, A. P.; LIMA, D. DE C.; FERREIRA, S. L. C. Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels – A review. **Talanta**, v. 73, p. 1-11, 2007.
- [182] CASSELLA, R. J.; BRUM, D. M.; LIMA, C. F.; CALDAS, L. F. S.; DE PAULA, C. E. R. Multivariate optimization of the determination of zinc in diesel oil employing a novel extraction strategy based on emulsion breaking. **Analytica Chimica Acta**, v. 690, p. 79-85, 2011.
- [183] AUCÉLIO, R. Q.; DOYLE, A.; PIZZORNO, B. S.; TRISTÃO, M. L. B.; CAMPOS, R. C. Electrothermal atomic absorption spectrometric method for the determination of vanadium in diesel and asphaltene prepared as detergentless microemulsions. **Microchemical Journal**, v. 78, p. 21-26, 2004.
- [184] QUADROS, D. P. C.; RAU, M.; IDREES, M.; CHAVES, E. S.; CURTIUS, A. J.; BORGES, D. L. G. A simple and fast procedure for the determination of Al, Cu, Fe and Mn in biodiesel using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 66, p. 373-377, 2011.
- [185] LOBO, F. A.; GOVEIA, D.; DE OLIVEIRA, A. P.; PEREIRA-FILHO, E. R.; FRACETO, L. F.; FILHO, N. L. D.; ROSA, A. H. Comparison of the univariate and multivariate methods in the optimization of experimental conditions for determining Cu, Pb, Ni and Cd in biodiesel by GFAAS. **Fuel**, v. 88, p. 1907-1914, 2009.
- [186] REYES, M. N. M.; CAMPOS, R. C. Graphite furnace atomic absorption spectrometric determination of Ni and Pb in diesel and gasoline samples stabilized as microemulsion using

conventional and permanent modifiers. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 60, p. 615-624, 2005.

[187] SANT'ANA, F. W.; SANTELLI, R. E.; CASSELLA, A. R.; CASSELLA, R. J. Optimization of an open-focused microwave oven digestion procedure for determination of metals in diesel oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal Hazardous Materials**, v. 149, p. 67-74, 2007.

[188] OROZCO, F. D. A.; KOVACHEV, N.; PASTOR, M. Á. A.; DOMINI, C. E.; BAND, B. S. F.; HERNÁNDEZ, A. C. Analysis of metals and phosphorous in biodiesel B100 from different feedstock using a Flow Blurring[®] multinebulizer in inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 827, p. 15-21, 2014.

[189] NOMNGONGO, P. N.; NGILA, J. C.; MSAGATI, T. A. M.; MOODLEY, B. Chemometric optimization of hollow fiber-liquid phase microextraction for preconcentration of trace elements in diesel and gasoline prior to their ICP-OES determination. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 141-147, 2014.

[190] CANDIOTI, L. V.; DE ZAN, M. M.; CÁMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123-138, 2014.

[191] HABILA, M. A.; YILMAZ, E.; ALOTHMAN, Z. A.; SOYLAK, M. Combination of dispersive liquid-liquid microextraction and multivariate optimization for separation-enrichment of traces lead by flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 37, p. 306-311, 2016.

[192] FERREIRA, S. L. C.; SANTOS W. N. L.; QUINTELLA, C. M. ; BARROS NETO, B. ; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. **Talanta**, v. 63, p. 1061-1067, 2004.

[193] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

[194] GRIJALBA, A. C.; MARTINIS, E. M.; WUILLOUD, R. G. Inorganic selenium speciation analysis in *Allium* and *Brassica* vegetables by ionic liquid assisted liquid-liquid microextraction with multivariate optimization. **Food Chemistry**, v. 219, p. 102-108, 2017.

[195] NIAZI, A.; KHORSHIDI, N.; GHAEMMAGHAMI, P. Microwave-assisted of dispersive liquid-liquid microextraction and spectrophotometric determination of uranium after optimization based on Box-Behnken design and chemometrics methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 135, p. 69-75, 2015.

[196] ASADOLLAHZADEH, M.; TAVAKOLI, H.; TORAB-MOSTAEDI, M.; HOSSEINI, G.; HEMMATI, A. Response surface methodology based on central composite design as a chemometric tool for optimization of dispersive-solidification liquid-liquid microextraction for speciation of inorganic arsenic in environmental water samples. **Talanta**, v. 123, p. 25-31, 2014.

- [197] SHAH, F.; KAZI, T. G.; NAEEMULLAH; AFRIDI, H. I.; SOYLAK, M. Temperature controlled ionic liquid-dispersive liquid phase microextraction for determination of trace lead level in blood samples prior to analysis by flame atomic absorption spectrometry with multivariate optimization. **Microchemical Journal**, v. 101, p. 5-10, 2012.
- [198] ROVEDA, A. C.; COMIM, M.; CAIRES, A. R. L.; FERREIRA, V. S.; TRINDADE, M. A. G. Thermal stability enhancement of biodiesel induced by a synergistic effect between conventional antioxidants and an alternative additive. **Energy**, v. 109, p. 260-265, 2016.
- [199] CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 127-134, 1999.
- [200] MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais**. 1ª ed. São Paulo: Varela, 1998, 150 p.
- [201] DE CAMPOS, T.; CANÉCHIO FILHO, V. **Principais Culturas v. II**, 2ª ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1973.
- [202] OLIVEIRA, M. F.; VIEIRA, O. V. **Extração de óleo de girassol utilizando miniprensa**. Londrina: Embrapa Soja, 2004, 27 p.
- [203] QU, Y.; SUN, L.; LI, X.; ZHOU, S.; ZHANG, Q.; SUN, L.; YU, D.; JIANG, L.; TIAN, B. Enzymatic degumming of soybean oil with magnetic immobilized phospholipase A₂. **LWT – Food Science and Technology**, v. 73, p. 290-295, 2016.
- [204] JIANG, F.; WANG, J.; KALEEM, I.; DAI, D.; ZHOU, X.; LI, C. Degumming of vegetable oils by a novel phospholipase B from *Pseudomonas fluorescens* BIT-18. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8052-8056, 2011.
- [205] GÜLLÜM, M.; BILGIN, A. Density, flash point and heating value variations of corn oil biodiesel-diesel fuel blends. **Fuel Processing Technology**, v. 134, p. 456-464, 2015.
- [206] BATISTA, A. D.; AMAIS, R. S.; ROCHA, F. R. P. Liquid-liquid microextraction in sequential injection analysis for the direct spectrophotometric determination of acid number in biodiesel. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 55-59, 2015.
- [207] ZHANG, W.; YUAN, W.; ZHANG, X.; CORONADO, M. Predicting the dynamic and kinematic viscosities of biodiesel-diesel blends using mid- and near-infrared spectroscopy. **Applied Energy**, v. 98, p. 122-127.
- [208] Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução nº 7, de 19 de março de 2008.
- [209] MERCK, E. **Merck's Index**. 2ª ed. Deutschland: Darmstadt, 1902, 394 p.
- [210] BARROS NETO, B. DE. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2010, 414 p.
- [211] NOGUEIRA, T.; DO LAGO, C. L. Determination of Ca, K, Mg, Na, sulfate, phosphate, formate, acetate, propionate and glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Microchemical Journal**, v. 99, p. 267-272, 2011.

[212] DEMIRTAS, I.; BAKIRDERE, S.; ATAMAN, O. Y. Lead determination at ng/mL level by flame atomic absorption spectrometry using a tantalum coated slotted quartz tube atom trap. **Talanta**, v. 138, p. 218-224, 2015.