

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM BIO-ÓLEO
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE
GRAFITE (GF AAS)**

PAOLLA RISSI SILVA HERMANN

Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes
Orientador

Porto Alegre, janeiro de 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Paolla Rissi Silva Hermann

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM BIO-ÓLEO
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE
GRAFITE (GF AAS)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes
Orientador

Porto Alegre, janeiro de 2023

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) pela excelência de ensino e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Programa de Recursos Humanos (PRH) 50.1 e à Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro que possibilitou a execução deste estudo.

Ao Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes pela orientação e conhecimento compartilhado; por participar ativamente do meu desenvolvimento como pesquisadora, desde a graduação até o mestrado.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Emilene Mendes Becker, Profa. Dra. Dirce Pozebon e Prof. Dr. Luiz Frederico Rodrigues, pela participação e pelas contribuições que proporcionaram o aprimoramento deste trabalho.

Aos professores Alberto Wisniewski Jr e João Otávio Trierweiler, que gentilmente disponibilizaram as amostras para a realização deste estudo.

À amiga Marianne, pela amizade e pelo auxílio; por ser um ponto de apoio durante a jornada acadêmica. Ao Alan, pela paciência em ensinar, pelas discussões científicas e pela participação direta no desenvolvimento deste projeto.

Aos meus pais, Rosângela e Paulo, por acreditarem em mim e por sempre me incentivarem na busca pelo conhecimento. Obrigada por todo o amor e tempo dedicado à minha formação.

Ao meu irmão, Guilherme, pelo exemplo de resiliência e dedicação. Aos meus avós, Ilso, Eurides e Amélia Therezinha (*in memoriam*), por todo o carinho e compreensão da minha ausência.

Ao Fabiano, por incentivar meus sonhos e partilhar comigo os momentos bons da vida. Obrigada pela paciência, apoio e companheirismo que tornaram a jornada mais leve.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 BIO-ÓLEO	16
2.2 CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM BIOCOMBUSTÍVEIS	25
2.3 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM BIOCOMBUSTÍVEIS	29
2.3.1 Diluição em solvente orgânico	30
2.3.2 Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)	33
2.3.3 Emulsão	35
2.4 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE (GF AAS)	42
3 OBJETIVOS	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	49
4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES	50
4.3 AMOSTRAS E MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO	51
4.4 PREPARO DA AMOSTRA	52
4.4.1 Microemulsão	52
4.4.2 Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	55
5.1.1 Infravermelho	56
5.1.2 Teor de água	58
5.2 MICROEMULSÃO COMO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA	61
5.2.1 Diagramas de fases ternários	61

5.2.2	Avaliação do efeito do ultrassom no aumento da massa de amostra	65
5.2.3	Caracterização das emulsões por espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	69
5.3	DETERMINAÇÃO DE Cr E Cu POR GF AAS	71
5.3.1	Otimização dos programas de temperatura.....	71
5.3.2	Avaliação de interferência provocada por efeito de matriz nas microemulsões	80
5.3.3	Estudo da estabilidade dos analitos nas microemulsões	82
5.3.4	Quantificação de Cr e Cu em bio-óleo por GF AAS	84
5.3.5	Figuras de mérito	86
5.3.5.1	Limites de detecção e quantificação	86
5.3.5.2	Avaliação da exatidão	89
6	CONCLUSÕES	92
7	REFERÊNCIAS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático do processo de pirólise. Adaptado de Huber e colaboradores. ¹⁸	17
Figura 2. Fenômenos envolvidos na desestabilização de emulsões.....	38
Figura 3. Diagrama esquemático do princípio de absorção atômica e atomizador de forno de grafite. Adaptado de Harris. ¹⁰⁸	43
Figura 4. Aspecto visual das amostras de bio-óleo utilizadas neste trabalho..	52
Figura 5. Análises das amostras A2 (—), A3 (—) e A4 (—) por FTIR.	56
Figura 6. Diagramas de fases ternários obtidos para o uso de (A) Triton X-100 (10% v/v) e (B) <i>n</i> -propanol como emulsificantes.	63
Figura 7. Avaliação do tempo de aplicação (s) e amplitude (%) do ultrassom na formação da emulsão, que foram: (A) 10 s e 40%; (B) 20 s e 40%; (C) 10 s e 25%; (D) 20 s e 25%.	66
Figura 8. Avaliação da estabilidade de emulsões preparadas a partir de <i>n</i> -propanol e US com adição de (A) 50, (B) 100, (C) 150 e (D) 200 mg de bio-óleo.	68
Figura 9. Distribuição do tamanho das gotas das emulsões formadas a partir de agitação manual (AM) e ultrassom (US) para (A) Triton X-100 (10% v/v) (40% O/A) e (B) <i>n</i> -propanol (44% A/O). As replicatas são indicadas por 1 e 2.	70
Figura 10. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Cr em microemulsão (—), em solução contendo 10 µg L ⁻¹ de Cr (—) e em solução contendo 10 µg L ⁻¹ de Cr na presença de 5 µg de Pd como modificador químico (—). As barras verticais indicam o desvio padrão (n=3).	72
Figura 11. Perfis dos sinais de fundo (BG) na determinação de Cr em bio-óleo para temperaturas de pirólise entre 900 e 1400 °C. A temperatura de atomização foi 2300 °C.	73
Figura 12. Perfis de absorbância AA (—) e BG (---) para microemulsão e AA (—) e BG (---) para solução, em meio <i>n</i> -propanol e água, contendo 10 µg L ⁻¹ de Cr.	74
Figura 13. Influência da velocidade de injeção do pipetador automático na absorbância do Cr para uma solução contendo 10 µg L ⁻¹ em meio <i>n</i> -propanol/água=1,2. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=3).....	75

Figura 14. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Cu em microemulsão (—), em solução contendo 10 µg L ⁻¹ de Cu (—) e em solução contendo 10 µg L ⁻¹ de Cu na presença de 5 µg de Pd como modificador químico (—). As barras verticais indicam o desvio padrão (n=3).	77
Figura 15. Avaliação da sensibilidade para a microemulsão (—) e para uma solução contendo 10 µg L ⁻¹ de Cu (—) na presença de 5 µg de Pd como modificador químico.	78
Figura 16. Perfis de absorvância AA (—) e BG (···) para microemulsão e AA (—) e BG (···) para solução, em meio <i>n</i> -propanol e água, contendo 10 µg L ⁻¹ de Cu.....	79
Figura 17. Efeito da matriz em microemulsões de bio-óleo na sensibilidade das curvas de calibração por adição padrão (●, —) e de calibração com solução padrão (●, - -) para (A) Cr e (B) Cu.	81
Figura 18. Avaliação da estabilidade de (A) Cr e (B) Cu em microemulsões de bio-óleo. As concentrações dos analitos foram monitoradas no dia do preparo das microemulsões (●, —) e após permanecerem uma semana em repouso (●, - -).	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programas de temperatura para a determinação de Cr e Cu por GF AAS.	50
Tabela 2. Relação das amostras de bio-óleo estudadas neste trabalho.	51
Tabela 3. Teor de água encontrado nas amostras de bio-óleo após titulação Karl Fischer (n=3).	58
Tabela 4. Concentrações de Cr e Cu encontradas nas amostras de bio-óleo preparadas na forma de microemulsão por GF AAS. Os resultados são a média e o desvio padrão para três determinações (n=3).	84
Tabela 5. Parâmetros de mérito do método proposto para a determinação de Cr e Cu em bio-óleo por GF AAS após preparo das amostras por microemulsão e calibração por adição padrão.	87
Tabela 6. Resultados obtidos para Cr e Cu em amostras de bio-óleo após preparo por microemulsão e por MW-AD. Os resultados são a média e o desvio padrão para três determinações (n=3).	89
Tabela 7. Análise do CRM HU-1 (<i>used oil</i>) para avaliação da exatidão na determinação de Cr e Cu por GF AAS após preparo por microemulsão. Os resultados são a média e o desvio padrão para três determinações (n=3).	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância, do inglês, *analysis of variance*

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

AM – Agitação manual

A/O – Emulsão do tipo água em óleo

ASTM – Sociedade Americana para Testes e Materiais, do inglês, *American Society for Testing and Materials*

CEN – Comitê Europeu de Normalização, do francês, *Comité Européen de Normalisation*

CRM – Material de referência certificado, do inglês, *certified reference material*

DLS – Espalhamento dinâmico de luz, do inglês, *dynamic light scattering*

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

FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, do inglês, *Fourier-transform infrared spectroscopy*

GF AAS – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês, *graphite furnace atomic absorption spectrometry*

HDO – Hidrodesoxigenação

HLB – Balanço hidrofílico-lipofílico, do inglês, *hydrophilic-lipophilic balance*

HR-CS GF AAS – Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite, do inglês, *high-resolution continuum-source graphite furnace atomic absorption spectrometry*

HTL – Liquefação hidrotérmica, do inglês, *hydrothermal liquefaction*

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

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

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*

KF – Karl Fischer

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

m₀ – Massa característica

MW-AD – Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês, *microwave-assisted wet digestion*

O/A – Emulsão do tipo óleo em água

ppb – partes por bilhão

ppm – partes por milhão

rpm – rotações por minuto

STPF – forno com plataforma de temperatura estabilizada, do inglês, *stabilized temperature platform furnace*

THF - Tetrahidrofurano

US – Ultrassom

RESUMO

O bio-óleo produzido a partir da pirólise rápida da biomassa é um importante biocombustível. Recentemente, um notável interesse tem sido dado à presença de contaminantes inorgânicos em biocombustíveis, em virtude da poluição ambiental e da perda de qualidade do combustível. Nesse sentido, no presente trabalho foi proposto o uso de microemulsão como método de preparo de amostras de bio-óleo para a posterior quantificação de Cr e Cu por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS). Para a formação das microemulsões, foram avaliados dois emulsificantes, *n*-propanol e Triton X-100, através da construção de diagramas de fases ternários. Este estudo possibilitou o preparo de microemulsões do tipo água em óleo (A/O), empregando, aproximadamente, 560 mg de bio-óleo, 240 mg de *n*-propanol e 200 mg de água, e do tipo óleo em água (O/A), empregando, aproximadamente, 400 mg de bio-óleo e 600 mg de Triton X-100 (10% v/v). As emulsões foram caracterizadas pela medida do diâmetro das gotas dispersas por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), e, desse modo, foram classificadas como microemulsões. As temperaturas de pirólise e atomização otimizadas para a quantificação dos analitos por GF AAS foram 1400 e 2100 °C para Cr, e 700 e 2000 °C para Cu, respectivamente. Possíveis interferências de matriz foram avaliadas através da construção de curvas de calibração com solução padrão e por adição padrão. Os resultados mostraram maior sensibilidade dos analitos na presença da matriz e, por essa razão, a técnica de calibração por adição padrão foi utilizada na quantificação dos analitos. Os sinais do Cr e do Cu foram monitorados após uma semana do preparo das microemulsões e nenhuma diferença significativa foi observada, comprovando a estabilidade dos analitos no sistema estudado. A exatidão do método proposto foi comprovada através da análise de material de referência certificado (HU-1 *used oil*) e da digestão das amostras por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas (MW-AD), cujos resultados obtidos foram concordantes em um nível de confiança de 95% (teste *t-student*). As concentrações de Cr e Cu, nas quatro amostras analisadas, variaram de 76,1 a 4881 e de 4,01 a 3668 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Os limites de quantificação (LQ) para Cr e Cu variaram de 2,45 a 4,58 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Palavras-chave: Bio-óleo, Cr, Cu, microemulsão, GF AAS.

ABSTRACT

Bio-oil produced by fast pyrolysis of biomass is an important biofuel. Recently, a remarkable interest has been given to the presence of inorganic contaminants in biofuels, due to environmental pollution and loss of fuel quality. In this way, the use of microemulsion was proposed as a sample preparation method for bio-oil samples for subsequent determination of Cr and Cu by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS). For microemulsions preparation, two emulsifiers were evaluated using ternary phase diagrams, such as *n*-propanol and Triton X-100. This study allowed the formation of water-in-oil microemulsions using about 560 mg of bio-oil, 240 mg of *n*-propanol and 200 mg of water, and oil-in-water microemulsion, using about 400 mg of bio-oil and 600 mg of Triton X-100 (10% w/v). Emulsions were characterized by measuring the diameter of dispersed drops by dynamic light scattering (DLS) technique, and, therefore, were classified as microemulsions. The pyrolysis and atomization temperatures for quantification of analytes by GF AAS were 1400 and 2100 °C for Cr, and 700 and 2000 °C for Cu, respectively. The presence of matrix interferences was evaluated by means of aqueous calibration standards and standard addition method. The results showed higher sensitivity for analytes in the presence of matrix and, for this reason, standard addition method was used for quantification step. The Cr and Cu signals were monitored one week after the microemulsion preparation and no difference was observed, demonstrating the stability of analytes. Accuracy of the proposed method was evaluated by analysis of certified reference material (HU-1 used oil) and by microwave-assisted wet digestion (MW-AD), and results were in agreement with a confidence level of 95% (t-student test). The concentrations of Cr and Cu in four analyzed samples ranged from 76.1 to 4881 and from 4.01 to 3668 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The limits of quantification (LOQ) for Cr and Cu ranged from 2.45 to 4.58 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Keywords: Bio-oil, Cr, Cu, microemulsion, GF AAS.

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, a demanda por independência energética dos países e os problemas ambientais relacionados à poluição e às mudanças climáticas contribuíram para o aumento da produção de energia a partir de fontes renováveis.¹ Recentemente, os estudos voltados à produção de energia mediante o uso de bio-óleo têm demonstrado sua potencialidade como combustível alternativo frente aos combustíveis fósseis. O bio-óleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos oxigenados com diferentes pesos e estruturas moleculares, que se encontram divididos entre fase aquosa e fase orgânica. Sua obtenção se dá, principalmente, através da pirólise, processo de decomposição termoquímica da matéria orgânica na ausência de oxigênio.^{2,3}

Por ser proveniente de biomassa, matéria orgânica biodegradável, o bio-óleo tem como vantagem ser uma fonte de energia mais limpa e renovável, contribuindo para a redução do acúmulo dos gases de efeito estufa. Ademais, a baixa concentração de metais e de enxofre, principais poluentes encontrados nos combustíveis de origem fóssil, confere atratividade à sua utilização como biocombustível.⁴ Ainda que o uso direto do bio-óleo como combustível automotivo não faça parte da realidade atual, seu potencial antimicrobiano e seu melhoramento por meio da hidroxidação para a obtenção de um combustível com características similares ao biodiesel têm sido investigados.^{5,6}

Visto a crescente demanda por fontes alternativas de energia, cada vez mais se tem a necessidade de controlar e monitorar a qualidade dos biocombustíveis empregados no modal rodoviário brasileiro. O monitoramento de metais, embora regulamentado pela ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis), destina-se somente aos contaminantes inorgânicos majoritários, presentes em nível de partes por milhão. Contudo, a presença de elementos minoritários, como Fe, Ni, Co, Cu, mesmo em baixas concentrações são prejudiciais à qualidade do combustível, conferindo diminuição da sua estabilidade e, subsequente, degradação.⁷ Ainda, podem ser observados danos às peças metálicas do motor e aumento da poluição ambiental por meio da emissão de material particulado.⁸

Com relação ao bio-óleo, a inserção de metais pode ocorrer por meio da biomassa, dos seus processos de tratamento, pelo uso de catalisadores e aditivos, ou durante as etapas de transporte e armazenamento.^{9,10}

A resolução nº 842, de 14 de maio de 2021, da ANP é a norma mais completa com relação ao monitoramento de contaminantes inorgânicos em biocombustíveis, exigindo o monitoramento de 22 elementos em diesel verde pela técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) após diluição da amostra em querosene. Apesar de a técnica ser multielementar e altamente sensível, a utilização de solventes orgânicos promove algumas desvantagens, como toxicidade, necessidade de calibração com padrões organometálicos, carregamento do plasma com matéria orgânica e limitações no sistema de introdução da amostra.¹¹ Além disso, problemas por deposição de carbono e por interferências de matriz são comumente observados na análise direta de matrizes altamente orgânicas.¹² Para o bio-óleo, contudo, não há norma regulatória para o seu uso como biocombustível.

Nesse sentido, o desenvolvimento de novas metodologias analíticas para a caracterização inorgânica de biocombustíveis é de grande importância. A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) destaca-se por permitir a análise de amostras com alto conteúdo orgânico, em decorrência da aplicação de um programa de tempo e temperatura que possibilita a eliminação de maior parte da matriz, e por conferir boa sensibilidade à determinação de elementos em baixa concentração. Ademais, a técnica permite a análise de amostras com nenhum ou pouco preparo prévio, diminuindo o tempo de ensaio e os riscos de contaminação e perda de analito.^{13,14}

O emprego de emulsões como método de preparo de amostra tem sido amplamente estudado na determinação de contaminantes inorgânicos em combustíveis e biocombustíveis, em virtude do rápido preparo da amostra, da menor carga orgânica do meio e do comportamento semelhante a soluções aquosas, aspectos que colaboram para o melhor desempenho e uso da técnica GF AAS na análise de rotina.¹³ As emulsões podem ser alternativas interessantes aos métodos de digestão por via úmida, pois não necessitam de grandes volumes de solução e de ácidos ou reagentes concentrados, fatores esses que aumentam o fator de diluição e, conseqüentemente, contribuem para o aumento dos limites de detecção (LD) e

quantificação (LQ). A possibilidade de preparo da amostra sem necessidade de equipamentos específicos é outro ponto positivo na aplicação das emulsões. Por outro lado, são escassos os trabalhos que investigam a formação e a caracterização das emulsões, sendo, na maioria das vezes, empregadas quantidades pré-definidas de amostra e reagentes.

Nesse contexto, foi desenvolvido, no presente trabalho, um método de preparo de amostras baseado na microemulsão para a determinação de Cr e Cu em bio-óleo por GF AAS. Para isso, foram avaliados diferentes emulsificantes na obtenção de microemulsões com altas massas de amostra, as quais foram caracterizadas quanto ao diâmetro das gotas dispersas. Também foram avaliados os parâmetros instrumentais da técnica GF AAS, a estabilidade dos analitos na microemulsão e as interferências provocadas por efeito de matriz.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIO-ÓLEO

No corrente cenário mundial, o Brasil ocupa a 5ª posição entre os países mais emissores de gases de efeito estufa, contribuindo com cerca de 3,2% da poluição climática global. Neste contexto, o setor energético, principalmente afetado pelo transporte e pela produção de combustíveis, é o terceiro maior responsável por essas emissões, perdendo apenas para o setor agropecuário e o desmatamento. Além disso, é o setor que, historicamente, mais cresce ao longo dos anos, em virtude da excessiva demanda pela exploração e uso dos combustíveis fósseis provocada pelo alto crescimento populacional, industrial e do setor de serviços.¹⁵ Mundialmente, as tensões entre os países ocasionadas por conflitos políticos e a preocupação pelas mudanças climáticas e pelo esgotamento das reservas de petróleo têm levado à busca por fontes de energia alternativas, visando a independência energética dos países e o controle da poluição ambiental.¹

Dentre as fontes alternativas de energia, o bio-óleo tem sido estudado nos últimos anos devido ao seu potencial de assemelhar-se ao biodiesel, após processo de melhoramento. Por ser produzido a partir de matéria orgânica biodegradável, o bio-óleo apresenta-se como uma fonte de energia mais limpa, renovável e de relativa fácil disponibilidade. Diferentemente dos combustíveis fósseis, o bio-óleo apresenta como vantagens a baixa concentração de metais, que prejudicam a qualidade do combustível, e de enxofre, principal contribuinte da chuva ácida.¹⁶ Além disso, o bio-óleo colabora para a redução do acúmulo de gases de efeito estufa na atmosfera, uma vez que o CO₂ liberado durante sua queima é absorvido pelas plantas, fonte de matéria orgânica, na etapa de fotossíntese.³ Em adição, contribui para a valorização de rejeitos oriundos, principalmente, de processos agroindustriais.

O bio-óleo, também conhecido como óleo de pirólise, líquido de pirólise, líquido de madeira, entre outras denominações, é uma mistura complexa de compostos orgânicos oxigenados de diferentes tamanhos moleculares formados a partir de reações de fragmentação dos três blocos de construção chave da biomassa: celulose, hemicelulose e lignina.² O bio-óleo consiste de uma emulsão formada pelas fases aquosa, que inclui água e compostos solúveis de baixo peso molecular, e orgânica, composta por macromoléculas de lignina pirolítica.¹⁷ Sua aparência é a de um líquido

viscoso marrom escuro, semelhante ao óleo bruto, com odor característico de fumaça.²

A principal forma de obtenção do bio-óleo é através da pirólise. A pirólise baseia-se na decomposição termoquímica da matéria orgânica na ausência de oxigênio para a obtenção de produtos sólidos, líquidos e gasosos. A reação de decomposição ocorre entre 300 e 700 °C, normalmente, à pressão atmosférica.^{3,17} O processo de pirólise envolve a inserção da biomassa em um reator, o qual é gradualmente aquecido para promover a secagem do material. Após atingir a temperatura de pirólise, inicia-se a decomposição termoquímica da biomassa, gerando gases e sólidos que são enviados até um ciclone com o auxílio de um gás carreador. No ciclone, é feita a retirada do produto sólido, chamado de biocarvão ou biochar, e os vapores são encaminhados até um condensador. A separação gás-líquido é feita em um condensador, onde os vapores não-condensáveis darão origem ao produto gasoso (CO, CO₂, CH₄, H₂), chamado de gás de pirólise, e os vapores condensáveis originarão o produto líquido, chamado de bio-óleo.¹⁸ Um esquema do processo de pirólise é apresentado na Figura 1.

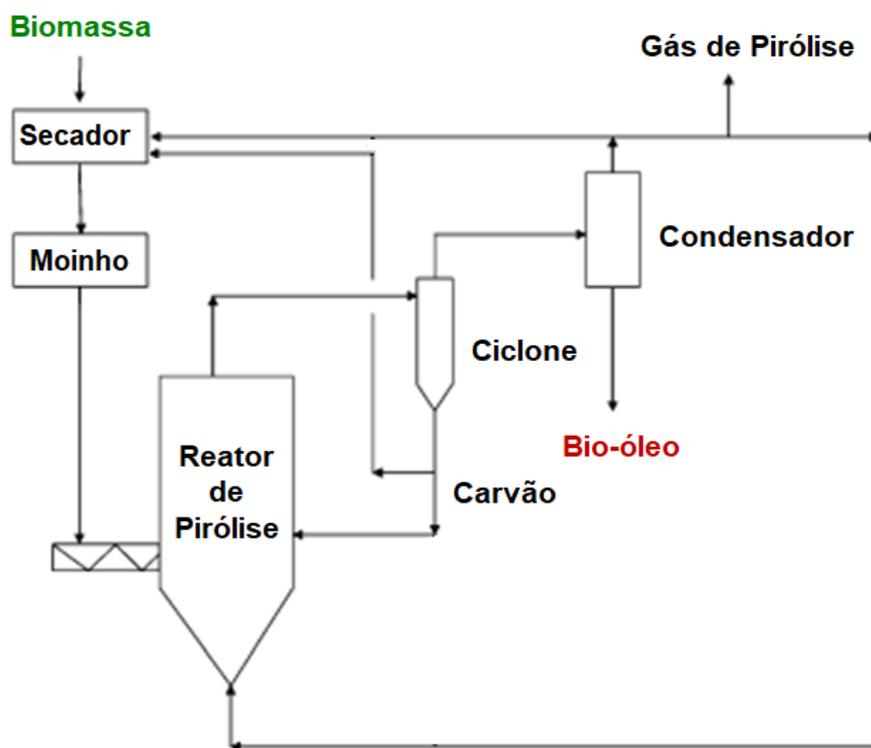


Figura 1. Diagrama esquemático do processo de pirólise. Adaptado de Huber e colaboradores.¹⁸

Os rendimentos e a composição dos produtos da pirólise são bastante variáveis e dependem de diversos fatores, tais como tipo e tamanho de partícula da biomassa, temperatura, taxa de aquecimento e tempo de residência dos vapores no reator.⁴ Enquanto longos tempos de residência favorecem a formação de produtos sólidos e gasosos, curtos tempos de residência tendem a favorecer a formação de produtos líquidos. Dessa forma, a pirólise pode ser dividida em três categorias: lenta, intermediária e rápida.^{19,20}

A pirólise lenta é destinada, principalmente, à obtenção de produtos sólidos e é realizada a baixas taxas de aquecimento ($0,1 - 2 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$) e longos tempos de residência (min – h). Em altas temperaturas ($300 - 500 \text{ }^\circ\text{C}$), esse processo é conhecido como carbonização, que consiste no mais antigo tratamento da biomassa para a produção de sólidos. Já em temperaturas mais baixas ($225 - 300 \text{ }^\circ\text{C}$), esse processo é denominado de torrefação e é destinado à obtenção de biocarvão (biochar) com maior densidade energética, uma vez que a água e os compostos orgânicos voláteis são removidos da biomassa previamente, gerando um biocarvão seco e com propriedades higroscópicas.¹⁹⁻²¹

A pirólise intermediária ocorre entre $300 - 500 \text{ }^\circ\text{C}$, com curtos tempos de residência (10 – 30 s) e é destinada à produção de líquidos. O produto obtido a partir da pirólise intermediária é um líquido menos viscoso e com menor rendimento que o obtido a partir da pirólise rápida. Contudo, biomassas com maior tamanho de partícula são aceitáveis para esse processo.^{19,21}

A pirólise rápida é o principal processo de pirólise para a obtenção de produtos líquidos, podendo atingir rendimentos de bio-óleo de até 80%. A reação ocorre em altas temperaturas ($400 - 600 \text{ }^\circ\text{C}$), com altas taxas de aquecimento ($10 - 1000 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$) e tempos de residência dos vapores no reator extremamente curtos ($0,5 - 2 \text{ s}$).^{20,22} Para garantir um alto rendimento e uma boa qualidade do produto final, alguns parâmetros devem ser estritamente cumpridos, como: *i*) altas taxas de aquecimento e transferência de calor; *ii*) controle de temperatura em, aproximadamente, $500 \text{ }^\circ\text{C}$; *iii*) tempo de residência menor que 2 segundos; *iv*) rápido resfriamento dos vapores de pirólise para a produção do bio-óleo. Entretanto, para atestar uma eficiente transferência de calor e uma alta taxa de aquecimento, a biomassa deve ser previamente seca, com teor de umidade inferior a 10%, e

finamente moída para a obtenção de partículas com, no máximo, 6 mm, a depender do tipo de reator, o que acaba por aumentar os custos do processo.^{23,24}

Ao longo dos anos, o processo de pirólise foi sofrendo adaptações a fim de melhorar a qualidade do produto final, principalmente a do bio-óleo, bem como de aprimorar os métodos existentes. Em vista disso, novos processos foram desenvolvidos, como a pirólise flash, a pirólise à vácuo e a liquefação hidrotérmica.

Assim como na pirólise rápida, a pirólise flash tem como objetivo principal a produção de bio-óleo. A temperatura durante o processo é mantida entre 400 – 600 °C; contudo, na pirólise flash, o tempo de residência é da ordem de milissegundos, o que favorece o rendimento do produto líquido ao mesmo tempo em que reduz a formação do produto sólido. Desse modo, os custos de separação são reduzidos e um produto de melhor qualidade é obtido.^{17,25}

Já a pirólise à vácuo é considerada uma modificação da pirólise lenta, pois é conduzida sob baixas taxas de aquecimento e longos tempos de residência, da ordem de 40 s. A grande vantagem da pirólise à vácuo é a obtenção de bio-óleo com rendimento e qualidade similares aos alcançados com a pirólise rápida, empregando biomassas com tamanho de partícula entre 2 e 5 cm. Isso só é possível pois, em condições de baixa pressão, as reações secundárias de condensação são reduzidas, fazendo com que o produto final tenha composição química similar à da matéria-prima original. Além disso, a fração orgânica do bio-óleo obtido por pirólise à vácuo possui compostos orgânicos mais leves que proporcionam uma maior extração de compostos fenólicos, o que é vantajoso quando se tem como objetivo a obtenção de produtos químicos. Todavia, existem algumas desvantagens na pirólise à vácuo, como a maior presença de água no produto final e os altos custos de instalação e manutenção das bombas de vácuo.^{22,25,26}

Um dos métodos mais recentes de transformação da biomassa é a liquefação hidrotérmica (HTL). O processo HTL baseia-se na decomposição da matéria orgânica em um solvente, normalmente água, em baixas temperaturas (180 – 370 °C), altas pressões (4 – 25 MPa) e longos tempos de residência (10 – 60 min), podendo ou não haver a presença de catalisador.^{26,27} O método de liquefação permite a utilização de biomassas com alto teor de umidade, como grama e plantas aquáticas, sem necessidade prévia de secagem, reduzindo os gastos energéticos. Além disso, o bio-óleo produzido por HTL tem maior densidade energética que o produzido por

pirólise rápida, uma vez que o teor de compostos oxigenados no produto final é menor.^{26,28} Devido à presença de água, heteroátomos como nitrogênio, enxofre, cloro e fósforo são oxidados aos seus respectivos ácidos inorgânicos e, portanto, devem ser neutralizados com a adição de base, acarretando em desvantagens ao processo. Ademais, são necessários equipamentos específicos, a fim de evitar a corrosão dos materiais.²⁹

Um dos parâmetros mais importantes da produção do bio-óleo é a biomassa, matéria-prima utilizada para a sua produção. A biomassa é um produto orgânico de origem não fóssil, derivada de plantas, animais, bactérias, fungos. É composta majoritariamente por água, celulose, hemicelulose e lignina e, em menor concentração, por extratos orgânicos e minerais. O tipo de biomassa e a proporção entre seus constituintes é fator determinante para o processo de pirólise, assim como para a composição e o rendimento dos produtos formados.^{4,24} As fontes de biomassa mais comuns são as culturas e os resíduos agrícolas (folha, caule, palha, caroço, semente não comestível), e as culturas e os resíduos florestais (serragem, cascas de árvores, madeiras de pinho, eucalipto, castanheiro). Embora as matérias-primas florestais sejam preferíveis devido ao maior rendimento de bio-óleo, as matérias-primas agrícolas são vantajosas no que se refere ao menor período de cultivo e à demanda por menor área plantada. Mais recentemente, bio-óleos obtidos a partir de plantas aquáticas, esterco e resíduos sólidos urbanos também têm sido investigados.^{19,21}

A grande vantagem da utilização da biomassa está relacionada ao uso de um resíduo altamente volumoso e de baixa densidade energética para a produção de um líquido de alta densidade e valor agregado. Além disso, para o processo de pirólise, é possível formar blendas de biomassas a fim de otimizar suas propriedades físico-químicas e produzir um óleo de melhor qualidade e baixo teor de cinzas.²¹ Contudo, é importante tomar nota que biomassas cultivadas exclusivamente para uso energético podem competir com o uso do solo destinado à produção alimentícia, assim como podem desencadear problemas ambientais a longo prazo devido ao desbalanceamento do ecossistema.²⁶

Devido à variedade de biomassas e dos parâmetros aplicados no processo de pirólise, bio-óleos com diferentes composições e propriedades podem ser obtidos. A composição elementar do bio-óleo é dada por carbono (54 – 58%), hidrogênio

(5 – 7%), oxigênio (35 – 40%) e nitrogênio (<0,2%), com baixas concentrações de enxofre e minerais, como sódio e cálcio. Além dos compostos base, o bio-óleo contém um teor variável de água entre 15 e 30% e de sólidos suspensos de até 1%.^{2,4,30} A água é o composto mais abundante no bio-óleo e o mais prejudicial para a sua utilização como combustível, pois afeta diretamente seu valor energético. O teor de umidade no produto final é altamente dependente dos parâmetros da pirólise e do tipo e pré-tratamento da biomassa, podendo atingir valores de até 60%.^{19,22} Pittman e colaboradores³¹ avaliaram o processo de pirólise rápida para a produção de bio-óleo a partir de caule de milho e observaram que o pré-tratamento ácido da biomassa reduzia em até 25% o teor de água no bio-óleo produzido. Além disso, os autores verificaram que bio-óleos formados em temperaturas de pirólise de 450 °C possuíam teor de umidade aproximada de 27%, enquanto que em 400 °C bio-óleos com até 54% de umidade eram produzidos.

Outras propriedades que são afetadas no bio-óleo são densidade, viscosidade, acidez e poder calorífico. A densidade do bio-óleo varia entre 1,1 e 1,3 g mL⁻¹ e tem implicação direta no funcionamento de bombas de caldeiras e motores.^{19,30} Já a viscosidade pode variar de 35 a 1000 cP e depende fortemente da eficiência de coleta dos compostos com baixo ponto de ebulição durante o resfriamento do bio-óleo. A viscosidade tende a aumentar com a temperatura e o tempo de estocagem devido às reações secundárias que ocorrem lentamente entre as moléculas presentes no óleo ou com o oxigênio atmosférico, fenômeno conhecido como envelhecimento.^{2,30} Bio-óleos com alta viscosidade aumentam os riscos de ruptura das tubulações e, por consequência, os custos de bombeamento.²⁵ A acidez do bio-óleo é outro fator importante e que impossibilita sua utilização direta como combustível. Devido à presença de ácidos orgânicos, como o ácido acético e o ácido fórmico, seu pH (2 – 3) impede o armazenamento em tanques de alumínio, fazendo-se necessária a estocagem em tanques feitos de materiais inoxidáveis ou poliméricos.¹⁹ Em adição, os grupamentos ácidos podem induzir as reações de degradação em blendas formadas a partir da adição de bio-óleo, conforme já observado no caso do biodiesel.³² Quanto ao poder calorífico, indicado como *Higher Heating Value* (HHV), os valores relatados variam, na maioria dos casos, entre 16 e 19 MJ/kg.^{24,25} Contudo, a depender dos parâmetros já mencionados, principalmente dos altos teores de água e oxigênio, bio-óleos com menor poder calorífico podem ser

obtidos, da ordem de 13 MJ/kg.^{33,34} Por outro lado, quando bio-óleos são produzidos a partir de biomassas previamente tratadas ou com baixo teor de água, poder calorífico de até 29 MJ/kg pode ser alcançado, conforme já relatado por alguns autores.^{35,36}

Em virtude dos altos teores de água e compostos oxigenados, o poder calorífico do bio-óleo é da ordem de duas vezes inferior ao encontrado em combustíveis fósseis (46 MJ/kg).³⁷ Além disso, sua instabilidade e imiscibilidade com derivados do petróleo inviabilizam sua utilização direta como combustível.³⁰ Por essa razão, ao longo dos anos foram estudadas e propostas formas de melhorar a qualidade do bio-óleo, como a hidrodesoxigenação e a pirólise catalítica.

O processo de hidrodesoxigenação (HDO) baseia-se no tratamento do bio-óleo em moderadas temperaturas (250 – 400 °C) e altas pressões (70 – 200 bar) de H₂, na presença de um catalisador. Seu objetivo é a eliminação de oxigênio na forma de água e a formação de hidrocarbonetos através de novas ligações saturadas C-C. O processo é semelhante ao que ocorre nas refinarias de petróleo para eliminação de compostos indesejados contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre.¹⁸ A HDO ocorre em duas etapas, onde na primeira são aplicadas temperaturas próximas a 250 °C a fim de estabilizar o bio-óleo e evitar reações de polimerização; já na segunda etapa são aplicadas temperaturas próximas a 400 °C para que ocorra a reação de hidrotratamento. O hidrotratamento do bio-óleo pode ser total, quando o produto final está pronto para fracionamento e destilação, ou parcial, quando necessita de um co-processamento após a HDO. Dependendo das condições aplicadas na HDO, a remoção de oxigênio pode atingir valores superiores a 95%.²⁴

Os catalisadores mais empregados na HDO são os de CoMo e de NiMo suportados em alumina.¹⁸ Recentemente, outros catalisadores tem sido estudados, como Ru/TiO₂,³⁸ Pd/C,⁶ (Zn, Ce ou Ni)/Al₂O₃,³⁹ (Pt ou Ni)/C.⁴⁰ Através da HDO, bio-óleos com poder calorífico semelhante ao dos combustíveis fósseis podem ser alcançados. Todavia, as altas pressões empregadas e o alto consumo de gás H₂ reduzem a viabilidade de realização e aumentam os custos do processo. Além disso, para a reação de hidrotratamento, é necessário que o bio-óleo seja revaporizado sobre o catalisador, diminuindo a eficiência térmica e aumentando os gastos energéticos.^{18,24}

Dessa forma, a pirólise catalítica se apresenta como uma alternativa mais promissora frente ao uso da HDO, uma vez que não necessita de revaporização do bio-óleo, não utiliza gás H_2 e pode ser realizada à pressão atmosférica.⁴¹ A pirólise catalítica tem como objetivo a remoção dos compostos oxigenados ao mesmo tempo em que promove o craqueamento dos compostos de alto peso molecular para a obtenção de cadeias carbônicas menores. A eliminação dos compostos oxigenados é feita através das reações de desidratação, descarbonilação e descarboxilação, onde os átomos de oxigênio são eliminados na forma de H_2O , CO e CO_2 , respectivamente.^{41,42} Nesta etapa, a reação de descarboxilação é preferível, uma vez que elimina dois átomos de oxigênio ao passo que mantém os átomos de hidrogênio, elemento em escassez na biomassa.⁴¹ Já o craqueamento é feito através das reações de despolimerização, oligomerização, alquilação, ciclização, e outras.^{43,44} Nesta etapa, tem-se como finalidade maximizar a clivagem de moléculas pesadas para a obtenção de compostos de baixo peso molecular, minimizando o craqueamento de moléculas leves em gases permanentes. Durante o craqueamento, ainda podem ocorrer reações de reforma catalítica, onde os gases olefínicos, como etileno e propileno, geram hidrocarbonetos líquidos de alto valor agregado.⁴¹

Ao longo dos anos, diversos tipos de catalisadores foram estudados para a reação de pirólise catalítica, sendo os mais usuais os catalisadores sólidos com sítios ácidos, como os óxidos metálicos e as zeólitas. Os óxidos metálicos, embora usados em menor grau que as zeólitas, produzem compostos mais estáveis durante a reação de craqueamento devido ao seu caráter anfótero, ou seja, de se comportar ora como ácido ora como base. Os catalisadores de óxidos metálicos mais comumente empregados são Al_2O_3 e SiO_2 . Contudo, óxidos metálicos sulfatados, como SO_4^{2-}/TiO_2 , SO_4^{2-}/SnO_2 e SO_4^{2-}/ZrO_2 , e óxidos metálicos simples, como CaO e MgO , também podem ser utilizados.^{43,45} As zeólitas, por sua vez, possuem maior poder de craqueamento, levando à obtenção de compostos de baixo peso molecular. Além disso, as zeólitas apresentam potencial de desoxigenação seletivo, aumentando a razão C/O no produto final.⁴² A principal zeólita utilizada no processo de pirólise catalítica é a HZSM-5, que pode ser utilizada na forma pura,^{10,46,47} dopada com metais de transição⁴⁸ ou combinada a um catalisador de óxido metálico.⁴⁹ Todavia, a desativação do catalisador, principalmente provocada pela deposição de coque na sua superfície, é ainda um problema altamente discutido.^{30,42}

Embora a utilização do bio-óleo como combustível esteja distante da realidade atual, diversos pesquisadores têm estudado seu comportamento de queima e seu potencial antimicrobiano em blendas com combustíveis fósseis. O emprego do bio-óleo como biocombustível pode se dar de forma completa, quando todo o produto obtido é aproveitado, ou de forma parcial, quando apenas alguma fração é utilizada. Em motores do ciclo diesel, foi verificado que a inserção do bio-óleo no combustível para a formação de blendas promoveu a redução das emissões de CO, hidrocarbonetos e fumaça, além de apresentar uma combustão mais limpa que a do combustível tradicional.^{50,51} Já em motores do ciclo Otto, foi notado o aumento da octanagem da gasolina através da adição do produto obtido a partir da esterificação de Fischer utilizando a fração aquosa do bio-óleo.⁵²

Com relação ao potencial antimicrobiano, o bio-óleo foi estudado através da sua adição em amostras de diesel B10. Sabe-se que a ocorrência de água em tanques de armazenamento, mesmo que em quantidades ínfimas, levam ao crescimento de micro-organismos e, conseqüentemente, à deterioração do combustível. Em virtude da ampla variedade de compostos com potenciais biocidas presentes no bio-óleo, pesquisadores verificaram que sua adição ao diesel em concentrações mínimas de 0,25% foi suficiente para promover a inibição do crescimento bacteriano, resultado que demonstra sua promissora utilização como aditivo para a preservação de biocombustíveis.^{5,53}

Devido aos problemas relacionados ao bio-óleo e à necessidade de seu melhoramento, seu uso ainda é restrito à obtenção de produtos químicos e à geração de calor.²¹ As normas americana ASTM (*American Society for Testing and Materials*) D7544 e europeia CEN (*Comité Européen de Normalisation*) EN16900 estabelecem especificações para o aproveitamento do bio-óleo como fonte combustível em queimadores. Pela norma ASTM, o bio-óleo é classificado em Grau G, direcionado ao uso em queimadores industriais, e Grau D, direcionado ao uso em queimadores industriais e comerciais. Nesse caso, o bio-óleo deve conter um teor menor de cinzas e sólidos suspensos. De modo geral para essa aplicação, é especificado um teor de umidade máximo de 30% e um poder calorífico (HHV) mínimo de 15 MJ/kg. Todavia, ainda não há norma regulatória para o uso do bio-óleo em motores automotivos.

2.2 CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM BIOCOMBUSTÍVEIS

A presença de contaminantes inorgânicos em combustíveis e biocombustíveis tem sido exaustivamente estudada ao longo dos anos, envolvendo diferentes matrizes, métodos de preparo da amostra e técnicas de determinação. No entanto, as normas existentes para o controle de qualidade de combustíveis e biocombustíveis são bastante limitadas, não exigindo, na maioria dos casos, o monitoramento desses contaminantes. Geralmente, as especificações são relativas às propriedades físico-químicas, como por exemplo a viscosidade, o poder calorífico, o teor de água, entres outros aspectos.

Em biocombustíveis, a incorporação de contaminantes inorgânicos pode se dar através da biomassa e dos seus processos prévios de tratamento,^{54,55} do uso de catalisadores e aditivos para o aprimoramento do produto final,^{10,56} ou pela lixiviação de metais presentes em ligas metálicas que compõem os tanques de armazenamento e transporte.^{9,57}

Com relação aos biocombustíveis empregados em veículos automotores do transporte rodoviário brasileiro, é de responsabilidade da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) estabelecer as especificações para o controle da qualidade do etanol e do biodiesel. Para o biodiesel, as especificações são dadas pela resolução 45/2014,⁵⁸ que normatiza o monitoramento dos elementos Na, K, Ca, Mg, S e P. Já para o etanol, as especificações são dadas pela resolução 19/2015,⁵⁹ a qual normatiza o monitoramento de apenas três elementos: Na, Fe e Cu. Embora o monitoramento de S seja requerido pela resolução, não há um limite máximo estabelecido para a concentração desse contaminante no biocombustível.

Ainda que sejam monitorados apenas os contaminantes inorgânicos em nível de partes por milhão (ppm), a contaminação dos combustíveis por elementos em nível de partes por bilhão (ppb) também é preocupante, não somente ao que se refere à poluição ambiental, como também à perda da qualidade do produto final.^{60,61} Elementos como Fe, Ni, Cu, Mn, Co, quando em contato com combustíveis, mesmo em baixas concentrações, têm efeito catalítico, que acaba por desencadear processos oxidativos, diminuindo a estabilidade do combustível e levando à sua degradação. Ademais, a presença desses contaminantes aumenta a corrosividade dos combustíveis devido à produção de ácidos graxos e à absorção de umidade, provocando o desgaste das peças metálicas do motor.^{7,62,63} Além dos contaminantes

já citados, elementos tóxicos, como Pb, As e Cd, podem estar presentes nos materiais particulados emitidos durante a combustão do combustível, acarretando em problemas ambientais.⁸

Dentre os contaminantes inorgânicos presentes em combustíveis e biocombustíveis, destaca-se o Cr e o Cu. Os compostos organometálicos de Cr, por vezes adicionado em combustíveis com o objetivo de melhorar as características de queima, são carcinogênicos e podem ser emitidos após a combustão na forma de fuligem.^{64,65} Já o Cu é o elemento que exerce maior efeito catalítico nos processos oxidativos de degradação, levando à formação de sedimentos que podem obstruir o filtro de combustível dos automóveis.⁶⁵ Jain e colaboradores observaram reduções de, pelo menos, 50% na estabilidade oxidativa do biodiesel para concentração mínima de Cu de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$.⁷

Devido à essa problemática, diversos pesquisadores estudaram a presença de contaminantes inorgânicos em biocombustíveis, principalmente em biodiesel, desenvolvendo metodologias analíticas adequadas para a determinação de elementos em baixas concentrações nesse tipo de amostra. Contudo, são escassos os trabalhos voltados ao estudo desses contaminantes em bio-óleo.

Nakadi e colaboradores⁶⁶ avaliaram o método de amostragem direta para a determinação de Si em biomassa e produtos originários da pirólise por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS). Os produtos avaliados foram cinzas, fração orgânica do bio-óleo, denominada neste trabalho como bio-óleo, e fração aquosa do bio-óleo, denominada como água de pirólise. A fração orgânica foi obtida após extração com clorofórmio e foi diluída em propanol previamente às análises. Além do uso de Rh como modificador químico permanente, foi empregado como modificador químico uma solução composta por Pd 0,1% m/v, Mg 0,06% m/v e Triton X-100 0,05% m/v. Para a curva de calibração, foram preparadas soluções em meio aquoso a partir de padrão inorgânico. A concentração média de Si encontrada nas três amostras analisadas de bio-óleo foi $1,38 \text{ mg kg}^{-1}$, que, segundo os autores, torna possível a aplicação do bio-óleo como combustível.

Duarte e colaboradores⁶⁷ também utilizaram a técnica HR-CS GF AAS e a amostragem direta para a determinação de Pb em biomassa e produtos originários da pirólise. Assim como no trabalho de Nakadi, a curva de calibração pôde ser preparada

em meio aquoso a partir de padrão inorgânico. Para as análises das frações aquosa e orgânica foi monitorada a linha espectral mais sensível, em 217,0 nm, devido à baixa concentração de Pb nas amostras. Já para as análises das cinzas e da biomassa foi monitorada uma linha atômica secundária, em 283,3 nm, uma vez que interferências espectrais foram observadas em 217,0 nm. Nenhum modificador químico precisou ser utilizado. Nas três amostras de bio-óleo, a concentração de Pb variou de 2,2 a 16,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Em trabalho desenvolvido por Evangelista⁶⁸, foi feita a síntese do bio-óleo a partir do óleo de soja empregando o processo de pirólise. A fração orgânica foi separada da fração aquosa em funil de separação após decantação. Evangelista avaliou o preparo da amostra por digestão por via seca (combustão em sistema aberto), em bloco digestor e em forno micro-ondas para a determinação de Fe, Cu, Cr, Ni e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS). Na decomposição por via seca foi adicionado, em cadinho de porcelana, 1 mL da amostra de bio-óleo, que permaneceu sob aquecimento em forno mufla por, aproximadamente, 5 h para a completa eliminação da matéria orgânica. Os resíduos foram dissolvidos em HNO_3 (1% v/v) e o volume da solução completado com água purificada previamente às determinações dos analitos. Na decomposição em bloco digestor, cerca de 1 mL de bio-óleo foi decomposto com água régia, H_2SO_4 , H_2O_2 e HNO_3 em sete etapas de aquecimento. O volume total de reagentes e o tempo total de decomposição foram 80 mL e 174 h, respectivamente. Já na digestão assistida por radiação micro-ondas, foi possível decompor 0,5 mL de bio-óleo em quatro etapas de aquecimento. Para tanto, foram adicionados à amostra 20 mL de reagentes (HNO_3 , H_2O_2 e H_2SO_4) em um tempo total de aquecimento de 1 h. As concentrações, em mg kg^{-1} , dos contaminantes avaliados neste estudo variaram de 6,02 – 6,43 (Fe); 2,84 – 3,08 (Cu); 0,14 – 0,19 (Cr); 0,32 – 0,47 (Ni); 6,04 – 6,32 (Zn), segundo os três diferentes métodos de preparo da amostra. Enquanto os métodos de decomposição por via úmida, em bloco digestor ou em forno micro-ondas, não apresentaram diferença significativa entre os resultados obtidos, a decomposição por via seca apresentou resultados cerca de 20% inferiores, possivelmente devido à perda dos analitos durante o aquecimento em forno mufla. Ademais, os LQs alcançados para a digestão em forno micro-ondas foram cerca de duas vezes inferiores aos alcançados

para a digestão em bloco digestor e de até onze vezes inferiores aos alcançados para a decomposição por via seca.

Recentemente, foi publicada pela ANP a resolução nº 842, de 14 de maio de 2021, que estabelece as especificações para o diesel verde.⁶⁹ O diesel verde abrangido por essa resolução pode ser produzido mediante cinco diferentes rotas sintéticas, sendo duas utilizando a biomassa como fonte de matéria-prima, a saber: *i*) a partir do gás de síntese, via processo Fischer-Tropsch; *ii*) a partir da fermentação de carboidratos. Embora o bio-óleo produzido por pirólise da biomassa não esteja incluso como uma das formas de obtenção do diesel verde, sabe-se que a produção de biocombustíveis a partir de seu melhoramento é de grande interesse nos últimos anos.⁷⁰

A ANP, nesta resolução, determina a fiscalização de 22 elementos químicos (Al, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Pd, Pt, Sn, Sr, Ti, V e Zn) e estipula um limite máximo de 1 mg kg⁻¹ por elemento. A presente resolução é a mais completa entre as normativas de combustíveis e biocombustíveis empregados em veículos automotores no modal rodoviário brasileiro no que se refere à determinação de contaminantes inorgânicos.

A norma estabelece que a determinação dos contaminantes seja feita segundo o método ASTM D7111, utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Embora a ICP OES seja uma técnica multielementar e de elevada sensibilidade, algumas desvantagens podem existir na análise direta de matrizes altamente orgânicas. Conforme recomendado pela norma, a curva de calibração deve ser preparada a partir de padrões organometálicos em solvente orgânico, que possuem um custo elevado quando comparados aos padrões em meio aquoso. Ainda, há a necessidade de uma etapa prévia de diluição das amostras em querosene, o que expõe o analista a solventes orgânicos de alta toxicidade. A análise de amostras com alto teor de compostos orgânicos por técnicas de ICP impõe especificidades na configuração do sistema de introdução da amostra, uma vez que a alta eficiência de transporte dos vapores orgânicos ao plasma leva à sua instabilidade ou, até mesmo, à sua extinção.^{11,71} Outras complicações verificadas são a deposição de carbono na tocha e no tubo injetor, que ocasiona perda de sensibilidade, e as severas interferências de matriz, provocadas pela interação do plasma com os solventes orgânicos.^{11,12} Ainda, a diferença das propriedades físicas,

como densidade e viscosidade, entre a amostra e as soluções de referência pode afetar a eficiência de transporte e, por consequência, a exatidão dos resultados.⁷²

Visto os problemas apresentados, destaca-se a importância do desenvolvimento de metodologias analíticas para o controle de qualidade de biocombustíveis, mediante métodos de preparo de amostras e técnicas de determinação adequados para a análise de contaminantes inorgânicos em baixo nível de concentração.

2.3 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM BIOCOMBUSTÍVEIS

O desenvolvimento de métodos analíticos para a caracterização inorgânica de combustíveis e biocombustíveis é de extrema importância. Embora algumas técnicas permitam a análise direta de amostras, como a análise por ativação neutrônica (NAA), a fluorescência de raios-X (XRF), a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e sistema de ablação a laser (LA-ICP-MS) e a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS), a grande maioria das técnicas analíticas para determinação de contaminantes inorgânicos exige a introdução da amostra na forma líquida. Ademais, o alto custo instrumental, a dificuldade de amostragem devido a problemas com homogeneidade e a falta de soluções e materiais de referência certificados são alguns inconvenientes encontrados na análise direta de amostras.⁷³

A ANP, agência responsável pela regulamentação e controle de qualidade dos combustíveis e biocombustíveis no Brasil, estabelece, através das normas ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), ASTM (*American Society for Testing and Materials*), ISO (*International Organization for Standardization*) e CEN (*Comité Européen de Normalisation*), os métodos para o monitoramento dos contaminantes Cu, Fe e Na em etanol e Na, K, Ca, Mg, S e P em biodiesel. Pelas normas, fica definido o uso das técnicas F AAS e ICP OES para a determinação desses contaminantes. Todavia, em ambas as técnicas, a amostra deve ser adequadamente preparada por diluição em um solvente adequado anteriormente à análise.

A etapa de preparo da amostra tem diversas funções, como a solubilização da matriz para liberação dos analitos, a extração dos analitos para um solvente adequado à técnica instrumental utilizada para a determinação do analito, a diluição da matriz

para minimização de interferências, a separação de espécies químicas ou até mesmo a concentração dos analitos.⁷⁴ Em contrapartida, o preparo da amostra é uma etapa bastante crítica da sequência analítica, uma vez que demanda tempo e consumo de reagentes, além da possibilidade de contaminação e perdas de analito por volatilização.^{73,75}

Diversos métodos de preparo de amostras têm sido investigados ao longo dos anos para a determinação de contaminantes inorgânicos em biocombustíveis, como diluição em solventes orgânicos,⁷⁶ decomposição por via seca,⁷⁷ decomposição por via úmida,⁷⁸ emulsão⁷⁹ e combustão.⁸⁰ Dentre estas, serão discutidas detalhadamente a diluição em solventes orgânicos, a decomposição por via úmida e a emulsão.

2.3.1 Diluição em solvente orgânico

O método de preparo baseado na diluição da amostra em solvente orgânico, como xileno, tolueno e querosene, possui algumas vantagens, como simplicidade, rapidez e facilidade de análise de biocombustíveis, uma vez que o solvente diminui a viscosidade de matrizes altamente oleosas, facilitando sua introdução no equipamento de medição do analito.⁶⁵ Embora este ainda seja o método oficial de preparo da amostra para a determinação de contaminantes inorgânicos em biodiesel e etanol, inúmeras desvantagens estão associadas a essa metodologia. Diferentemente dos combustíveis fósseis, os biocombustíveis podem ser obtidos a partir de uma ampla variedade de matérias-primas, o que afeta diretamente a composição química do produto final e, por vezes, não garante a completa diluição com um único solvente. Dessa forma, a análise de amostras com diferentes viscosidades e densidades é dificultada. Além disso, muitos contaminantes estão presentes em baixa concentração, fazendo com que o método de diluição da amostra não seja a alternativa mais adequada.⁷²

Outros fatores que tornam o método de diluição pouco atrativo são a toxicidade dos solventes orgânicos empregados, a instabilidade dos analitos nesse meio, a necessidade de padrões organometálicos e as interferências observadas nas técnicas F AAS e ICP OES. Com relação à estabilidade dos analitos, podem ser observadas variações significativas de suas concentrações durante o período de estocagem ou até mesmo durante a análise, em razão da possível adsorção dos analitos na parede do frasco e da evaporação do solvente.¹³

Pessoa e colaboradores⁸¹ estudaram os métodos de amostragem direta, diluição em tolueno e emulsão na determinação de Cr em óleo bruto por GF AAS. Os autores observaram que o sinal analítico para amostras preparadas na forma de emulsão permanecia estável por, pelo menos, cinco dias, enquanto que para amostras diluídas em tolueno permanecia estável por, no máximo, um dia. Além disso, foi observado que, para frações pesadas ($^{\circ}\text{API}<15$), ocorria separação de fases após poucas horas da diluição. Outro ponto estudado pelos autores foi a sensibilidade frente a calibrações preparadas com padrões aquosos e organometálicos. Nesse estudo, foi verificado que a calibração a partir de padrões inorgânicos em meio aquoso não apresentou diferença significativa à calibração preparada com padrões organometálicos quando a amostragem direta ou a emulsão foram empregadas. Já no método de diluição da amostra em solvente orgânico, a sensibilidade da curva de calibração utilizando padrão organometálico em tolueno foi diferente da sensibilidade alcançada pela curva de calibração utilizando padrão inorgânico em meio aquoso (HNO_3 0,2% v/v). Nessas condições, o padrão organometálico apresentou sensibilidade cerca de 24% superior ao padrão inorgânico, provavelmente devido a efeitos de matriz.

O método de diluição em solvente orgânico aliado a técnicas de determinação como F AAS e ICP OES também apresenta alguns inconvenientes. As técnicas que utilizam a nebulização pneumática como sistema de introdução da amostra, são altamente afetadas pelas propriedades físico-químicas da solução, como viscosidade, densidade e tensão superficial. Quanto menor for a viscosidade e a tensão superficial da solução mais facilitado será o transporte do aerossol ao plasma. O solvente utilizado na diluição das amostras também é outro fator importante. Embora a alta volatilidade do solvente associada à formação de finos aerossóis aumente a concentração de analito na chama e no plasma, o conteúdo da matriz também é aumentado, causando efeitos indesejáveis.⁷²

Na técnica de ICP OES, a introdução de um alto conteúdo orgânico no plasma leva a modificações na sua geometria e no seu comportamento, diminuindo sua densidade eletrônica e temperatura. Nesses casos, é verificada a instabilidade ou, até mesmo, a extinção do plasma.^{11,71} Além disso, são observadas emissões das moléculas do solvente e a formação de depósitos de carbono na tocha e no tubo injetor.^{13,72} Outro fator que é significativamente alterado em razão das propriedades

físicas do solvente é a robustez do plasma. Como forma de contornar esses problemas, alguns pesquisadores recorrem ao uso de O₂ como gás auxiliar, a fim de reduzir os depósitos de carbono e os efeitos do solvente orgânico no plasma. Entretanto, a proporção estequiométrica deve ser bem controlada, visto que a formação de óxidos pode ocasionar danos ao equipamento.¹² Uma outra alternativa é diminuir as vazões da amostra e do gás nebulizador, limitando a quantidade de conteúdo orgânico que atinge o plasma. Contudo, a diminuição excessiva desses parâmetros pode levar à perda de sensibilidade.⁷² Nesse sentido, a utilização da câmara de nebulização com controle de temperatura é uma estratégia interessante, pois, através do resfriamento da solução a temperaturas próximas a 0 °C, minimiza a quantidade de solvente carregado ao plasma, melhorando consideravelmente o sinal analítico.^{82,83}

Chaves e colaboradores⁷⁶ desenvolveram um método para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, S e Zn por ICP OES em amostras de biodiesel e óleo vegetal após diluição em solvente orgânico. Para o preparo das amostras, 200 mg de óleo vegetal ou 450 mg de biodiesel foram adicionadas de 25 µL de HNO₃ e Y como padrão interno (concentração final de 1 mg L⁻¹). As amostras foram diluídas a 2,5 mL em etanol ou *n*-propanol. Para a minimização das interferências espectrais, principalmente observadas para P e S, cujas linhas de emissão proeminentes estão na região de baixo UV (< 200 nm), os autores avaliaram o uso da câmara de nebulização com controle de temperatura como forma de introdução da amostra no ICP. Foi verificado que o resfriamento da câmara de nebulização a -5 °C era suficiente para a redução significativa da intensidade do sinal de fundo (BG), enquanto que menores temperaturas não promoviam efeito adicional na redução do BG. Os autores também avaliaram a estabilidade dos analitos nas amostras diluídas por, aproximadamente, 2h e não foram observadas alterações no sinal analítico durante este período. Os LDs alcançados variaram de 0,001 a 0,4 µg g⁻¹, não diferindo entre o uso de etanol ou *n*-propanol como solvente. Embora esses LDs sejam baixos, alguns analitos não foram detectados nas amostras de biodiesel, em virtude da baixa concentração em que estão presentes nos óleos usados como matéria-prima para a produção do biodiesel.

2.3.2 Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)

Nas últimas décadas, houve um aumento expressivo do número de publicações relatando o emprego da radiação micro-ondas no preparo de amostras. Com o avanço da química analítica, cada vez mais houve a necessidade de métodos de decomposição altamente eficientes, que permitissem o uso de alta pressão e temperatura, reduzindo o tempo de preparo da amostra e o consumo de reagentes.⁷³ Além disso, o desenvolvimento de métodos de decomposição em sistema fechado contornou os problemas até então encontrados, como a perda dos analitos por volatilização e a contaminação cruzada ou por fontes externas.^{74,75}

A radiação micro-ondas é uma radiação eletromagnética não ionizante, ou seja, que não causa alteração na estrutura molecular. A ação das micro-ondas se dá através dos fenômenos de migração iônica e rotação de dipolo, que movimentam as moléculas do meio e, conseqüentemente, aumentam sua temperatura. Dessa forma, a escolha do solvente é essencial para uma boa eficiência de decomposição.⁷³ Diversas matrizes já foram decompostas através da MW-AD, como alimentos, polímeros, combustíveis, efluentes e tecidos biológicos, normalmente por meio de ácidos concentrados, tais como HNO₃, HCl, H₂SO₄, HF.^{73,74}

Korn e colaboradores⁸⁴ avaliaram a radiação micro-ondas em sistema fechado na digestão de amostras de biodiesel. Neste estudo, foi feita a determinação de Na, K, Ca, Mg e P por ICP OES utilizando Y como padrão interno. Para a decomposição da amostra, foram utilizados 250 mg de biodiesel, 7 mL de HNO₃ e 1 mL de H₂O₂. Em um primeiro momento, foi feita a adição de HNO₃ às amostras de biodiesel, e a mistura foi mantida em repouso por 30 min para uma pré-digestão. Após, foi adicionado H₂O₂ à mistura, e esta foi submetida a um programa de aquecimento dividido em cinco etapas: i) 4 min em 500 W; ii) 2 min em 750 W; iii) 6 min em 1000 W; iv) 10 min em 1000 W; v) 5 min em 750 W. O carbono e acidez residual foram 0,614% e 4,05 mol L⁻¹, respectivamente, demonstrando a alta eficiência de decomposição. Embora a acidez residual seja alta, as interferências de transporte puderam ser facilmente contornadas com o auxílio do padrão interno, sem necessidade de uma etapa prévia de diluição. Os LDs variaram de 0,02 a 0,40 µg g⁻¹, permitindo a quantificação dos analitos nas três amostras analisadas. Em todas as amostras, as concentrações de Ca e K foram superiores a 5 mg kg⁻¹, ultrapassando o limite permitido pela legislação para o somatório das espécies Ca+Mg e K+Na. Já para Na,

uma das amostras estava em conformidade com a norma, enquanto as outras duas continham teores acima do máximo permitido. Para Mg, todas as amostras apresentaram concentrações abaixo de 5 mg kg^{-1} . Esses resultados indicaram que, mesmo após a lavagem do biodiesel, os resíduos de catalisador permaneceram no produto final.

De modo geral, os trabalhos que relatam a utilização da radiação micro-ondas para o preparo de amostras com alto teor de matéria orgânica, como os combustíveis e os biocombustíveis, fazem uso de ácidos concentrados. Apesar da alta eficiência de decomposição, o uso de ácidos concentrados aumenta o consumo de reagentes e, por vezes, impossibilita a determinação de elementos em baixa concentração, uma vez que se faz necessária a diluição das amostras a fim de evitar interferências na etapa de quantificação do analito. Nesse sentido, o emprego de soluções ácidas diluídas com regeneração *in situ* do HNO_3 tem sido proposto. As reações de regeneração dependem de três principais fatores: sistema fechado, presença de O_2 no meio reacional, que pode ser dar pela pressurização dos frascos com ar, O_2 ou pela adição de H_2O_2 , e gradiente de temperatura no frasco de reação.⁷³

Barela e colaboradores⁷⁸ propuseram um método de digestão de biodiesel por meio de ácido nítrico diluído para a determinação de elementos traço pela espectrometria de massa com setor eletromagnético com plasma indutivamente acoplado (SF-ICP-MS). Os autores avaliaram soluções de HNO_3 1, 2, 3,5, 7 e $9,3 \text{ mol L}^{-1}$, combinadas ao uso de H_2O_2 como agente auxiliar de oxidação. Os volumes de H_2O_2 avaliados foram 1, 1,5, 2 e 3 mL. Também foi avaliado o uso de HNO_3 concentrado sem adição de H_2O_2 . O programa de aquecimento para a digestão das amostras consistiu de três etapas: *i*) rampa de 20 min até 900 W; *ii*) permanência por 20 min em 900 W; *iii*) resfriamento por 20 min a 0 W. Segundo o método proposto, foi possível decompor até 700 mg de biodiesel empregando como solução digestora 4 mL de HNO_3 7 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 (30% m/m). A eficiência de digestão foi avaliada através do teor de carbono residual, que foi de 8,7%. Embora este valor seja alto, os autores não observaram interferências na quantificação dos analitos. A acidez residual foi menor que 10% e, portanto, não houve necessidade de etapa prévia de diluição. Posteriormente, foi feita a determinação de Ba, Cu, Cr, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, V e Zn por SF-ICP-MS utilizando In como padrão interno. Os LDs alcançados variaram de 1 a $14 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, exceto para Zn, cujo LD foi de $239 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Embora os LDs sejam

baixos, em duas das três amostras de biodiesel analisadas, somente Ba, Cu e Mo foram detectados.

2.3.3 Emulsão

As emulsões têm sido extensivamente estudadas nos últimos anos como forma de introdução de amostras de combustíveis e biocombustíveis em técnicas de espectrometria atômica, uma vez que permitem a estabilização da amostra e, conseqüentemente, dos analitos em uma dispersão homogênea com características físico-químicas próximas às de uma solução aquosa. Ao mesmo tempo, as emulsões reduzem a carga orgânica do meio, diminuindo possíveis interferências nas técnicas de ICP.¹³

Emulsões são sistemas dispersos ou coloidais de dois líquidos imiscíveis, onde o constituinte de menor concentração, chamado de fase dispersa, é disperso na forma de gotas de tamanho microscópico no constituinte de maior concentração, chamado de fase contínua.^{85,86} Para formar uma emulsão, é preciso que haja fase aquosa, fase orgânica, surfactante e energia.⁸⁷ Embora possam ser formadas emulsões puramente pela mistura de dois líquidos imiscíveis, esses sistemas são bastante instáveis e rapidamente observa-se a separação das fases.⁸⁵

Para entender o princípio de formação das emulsões do ponto de vista termodinâmico é preciso analisar a energia livre do sistema, dado pela equação modificada da segunda lei da termodinâmica (1), onde G é a energia livre de Gibbs, A é a área do sistema, γ_{12} é a tensão interfacial entre os líquidos 1 e 2, T é a temperatura e S é a entropia.

$$\Delta G = \Delta A \cdot \gamma_{12} - T \cdot \Delta S \quad (1)$$

Considerando que γ_{12} e T são independentes do tamanho de gota do líquido disperso, a variação de energia de um estado I para um estado II é unicamente dependente da entropia e da área total do sistema, sendo ambas as variáveis positivas. Uma vez que na formação de um sistema dispersivo a área final das microgotas é significativamente maior que a área inicial ($A_2 \gg A_1$), o termo $\Delta A \cdot \gamma_{12}$ tende a ser, na maioria dos casos, maior que o termo $T \cdot \Delta S$, fazendo com que a energia livre (ΔG) seja positiva. Dessa forma, é compreensível que as emulsões sejam sistemas termodinamicamente instáveis e não espontâneos, necessitando de energia

externa para a sua formação, que pode ser fornecida por agitação manual ou mecânica.^{86,88}

A presença de surfactante também é fundamental para a formação e estabilização de emulsões. Os surfactantes, também chamados de emulsificantes, estabilizantes ou tensoativos, são moléculas anfifílicas responsáveis por reduzir a tensão superficial da água, geralmente usada como fase aquosa, e a tensão interfacial entre a fase aquosa e a fase orgânica.^{89,90} Além de reduzir a contribuição positiva do primeiro termo da energia livre de Gibbs ($\Delta A.\gamma_{12}$), auxiliando na estabilidade das emulsões, os surfactantes também têm papel importante na formação das emulsões através da redução da pressão de Laplace (p), dada pela equação (2), onde R é o raio das gotas dispersas.

$$p = \frac{\gamma}{2R} \quad (2)$$

A pressão de Laplace é a diferença de pressão entre o lado interno e externo das gotas, e é um indicativo da energia externa necessária para transformar uma gota maior em uma gota menor. Quanto menor o valor de p , menor é a energia externa necessária e mais facilitada é a formação das emulsões.^{86,87,91}

Os surfactantes são classificados de acordo com a sua estrutura química e podem ser divididos em catiônicos, aniônicos, não iônicos e anfóteros.^{92,93} Sendo assim, quanto mais polar for o surfactante, mais solúvel ele será na fase aquosa e, preferencialmente, serão formadas emulsões do tipo óleo disperso em água (O/A). Por outro lado, quanto mais apolar for o surfactante, mais solúvel ele será na fase orgânica e, preferencialmente, serão formadas emulsões do tipo água dispersa em óleo (A/O).⁸⁸

Com o objetivo de medir quantitativamente a polaridade ou apolaridade de um surfactante e prever o tipo de emulsão formada, Griffin desenvolveu, em 1949, o conceito de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB). O HLB é uma escala arbitrária de 1 a 20, onde 1 representa o surfactante com maior caráter lipofílico e 20 representa o surfactante com maior caráter hidrofílico.^{89,94} Surfactantes com HLB entre 3 e 6 favorecem a formação de emulsões do tipo A/O, enquanto que aqueles com HLB entre 8 e 18 favorecem a formação de emulsões do tipo O/A.^{86,88}

A estabilidade das emulsões é afetada por diversos fenômenos físicos que podem ocorrer simultaneamente ou consecutivamente, de forma conjunta ou individual. A ocorrência desses fenômenos pode variar de segundos a anos e é diretamente dependente das forças envolvidas entre as fases. Os fenômenos que contribuem para a desestabilização e a quebra das emulsões são categorizados como *creaming*, sedimentação, floculação, coalescência, inversão de fase e *Ostwald ripening* (Figura 2).^{92,93} Os processos de sedimentação e de *creaming* ocorrem através das forças gravitacional e/ou centrífuga, onde, pela diferença de densidade entre as duas fases, há o deslocamento das gotas para o fundo ou para o topo, sem alteração na distribuição de tamanho das gotas. Em casos extremos, é observada a junção das gotas e a completa separação das fases. No processo de floculação ocorre a agregação das gotas sem ruptura da sua superfície, ou seja, não há variação no tamanho das gotas. Esse fenômeno é resultante das forças atrativas de Van der Waals e ocorre quando a repulsão eletrostática é insuficiente para manter as gotas afastadas. A coalescência, por sua vez, é um processo similar à floculação, porém mais extremo e, portanto, irreversível. Nesse caso, ocorre o afinamento e, conseqüentemente, a ruptura da superfície das gotas, fazendo com que uma gota maior seja formada a partir de duas ou mais gotas menores. Assim como na sedimentação e no *creaming*, na coalescência pode haver a completa separação das fases. Já o processo de inversão de fase se dá quando uma emulsão O/A é convertida em uma emulsão A/O, ou vice-versa, podendo ser produzidas emulsões múltiplas durante a transição das fases. Por fim, o fenômeno de *Ostwald ripening*, ou amadurecimento de Ostwald, se dá especialmente em emulsões polidispersas e ocorre quando a fase dispersa tem certa solubilidade na fase contínua. Nesse caso, as menores gotas, solubilizadas na fase contínua, transferem massa às gotas maiores através da difusão, resultando no aumento do tamanho médio das gotas.^{85,86}

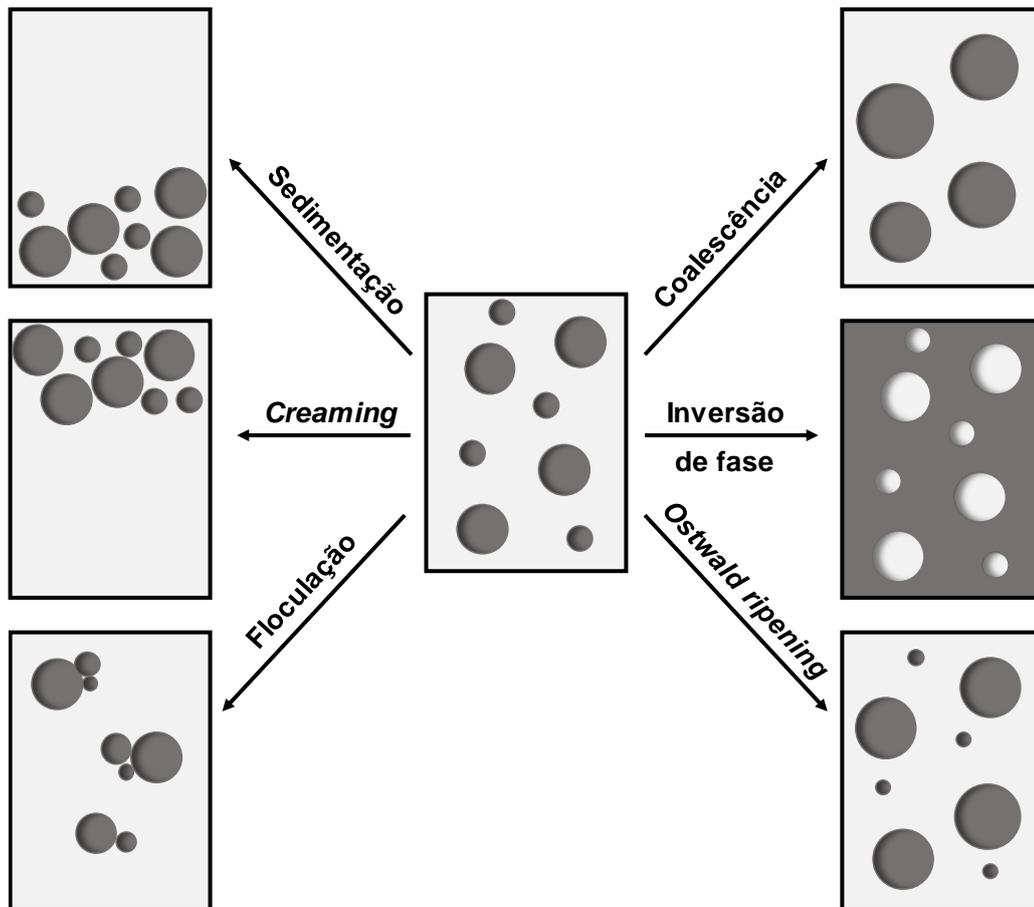


Figura 2. Fenômenos envolvidos na desestabilização de emulsões.

As emulsões podem ser classificadas em macroemulsões, microemulsões e nanoemulsões.⁹⁰ Embora a IUPAC defina as emulsões com base na terminologia usada na área de estudo de polímeros e as subdivida em macroemulsões, miniemulsões e microemulsões exclusivamente pelo tamanho das gotas dispersas, os trabalhos mais recentes, voltados ao estudo de emulsões, consideram outros fatores para a sua classificação. Além do tamanho das gotas, a estabilidade, a forma de preparo e a concentração de surfactante também são considerados.^{95,96}

As macroemulsões são consideradas sistemas bifásicos, com alto grau de polidispersão e termodinamicamente instáveis, ou seja, que tendem a sofrer separação de fase com o tempo. O tamanho das gotas das macroemulsões pode variar de 1 a 100 μm , o que faz com que sua aparência seja a de um líquido leitoso altamente viscoso.^{90,97}

As microemulsões, por sua vez, são sistemas monofásicos translúcidos, com baixo grau de polidispersão e termodinamicamente estáveis.⁹⁰ Devido à alta concentração de surfactante, da ordem de 20%, a formação das microemulsões se dá

espontaneamente, sem necessidade de fornecimento de energia externa. Contudo, do ponto de vista prático, geralmente é empregada a agitação manual como fonte de energia externa a fim de romper a barreira cinética e acelerar o processo de formação da emulsão.^{95,98} Os métodos de formação de emulsão mais comuns são a inversão de fase e a titulação de fase, onde neste último é possível obter como resposta final um diagrama de fases ternário, que é uma ferramenta útil para conhecer o comportamento da emulsão ao longo de toda a faixa de concentração dos componentes que a constituem.⁹⁹ Arranjos estruturais esféricos, cilíndricos e planares, com tamanho de gota variável entre 100 e 400 nm, podem ser encontrados nas microemulsões, a depender das condições ambientais e da proporção água/óleo/surfactante.^{98,100}

Já as nanoemulsões, embora se pareçam com as microemulsões por serem sistemas monofásicos translúcidos, têm gotas com tamanho variável entre 1 e 100 nm, e por essa razão são termodinamicamente instáveis mais polidispersas que as microemulsões.^{90,97} A concentração de surfactante presente em nanoemulsões é baixa, da ordem de 3 a 10%, e a sua formação não se dá de forma espontânea, como no caso das microemulsões. Para atingir tamanhos de gota nanométricos é preciso que haja uma fonte de energia externa, onde são empregados, geralmente, os métodos de alta energia, como ultrassom e homogeneização à alta pressão.^{99,101} Diferentemente das microemulsões, o arranjo estrutural encontrado nas nanoemulsões é preferencialmente esférico.⁹⁵

Apesar de haverem muitos parâmetros que devam ser levados em consideração na hora de classificar uma emulsão, os trabalhos publicados na área são bastante discordantes e as técnicas disponíveis para caracterização ainda se baseiam apenas no tamanho das gotas dispersas. As técnicas mais usuais para a determinação do tamanho das gotas são o espalhamento dinâmico de luz, espalhamento de raios-x, microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura.^{101,102} Todavia, deve-se lançar mão de técnicas que permitam a análise de outros parâmetros das emulsões, como reologia, condutividade elétrica e tempo de coalescência.⁹⁹

Em termos de preparo de amostras, as microemulsões têm sido amplamente empregadas, devido à simplicidade, rapidez no preparo e estabilidade.

Raposo e colaboradores¹⁰³ desenvolveram um método para a determinação simultânea de Na, K e Ca em biodiesel após preparo das amostras por emulsão. A quantificação dos analitos foi feita pela técnica de espectrometria de emissão atômica com chama (F-AES), utilizando Li como padrão interno. Neste trabalho, foi estudada a influência da quantidade de Triton X-100, usado como surfactante, e HNO₃ no preparo das emulsões, mantendo fixa a massa de biodiesel e o volume de *n*-butanol, usado como co-surfactante. Foram avaliados a massa de Triton X-100 (0,6 a 1,0 g) e o volume de HNO₃ (0,3 a 0,7 mL), onde a resposta (variável dependente) considerada foi a sensibilidade. O elemento menos influenciado pelas variáveis foi o Na, possivelmente devido à sua alta concentração, da ordem de dez vezes superior aos demais elementos. Após a otimização, pôde ser formada uma emulsão do tipo O/A composta por 1 g de biodiesel, 0,4 mL de HNO₃ concentrado, 1 mL de *n*-butanol, 1 g de Triton X-100 e H₂O até massa final de 10 g. Para a formação da emulsão foi necessário 1 min de agitação em vórtex e 5 min em banho de ultrassom. O sinal dos analitos foi monitorado para a avaliação da estabilidade, e os mesmos mantiveram-se constantes por um período de até 7 h. Os LQs alcançados foram 0,05, 0,02 e 1,0 mg kg⁻¹ para Na, K e Ca, respectivamente.

Em outro estudo, desenvolvido por Silva e colaboradores¹⁴, foram avaliados diferentes tipos de calibração para a determinação de Cd, Pb e Tl em microemulsões de biodiesel por GF AAS. A microemulsão foi formada a partir de 2 g de biodiesel, 1 mL de HNO₃ (10% v/v) e *n*-propanol até volume final de 10 mL. A mistura foi agitada manualmente até a obtenção de uma microemulsão homogênea. As temperaturas de pirólise para Cd, Pb e Tl foram 600, 800 e 600 °C, respectivamente, enquanto que as temperaturas de atomização foram 1300, 1800 e 1700 °C, respectivamente. Como modificador químico permanente, foram utilizadas soluções de Pd (para Cd e Tl) e Ru (para Pb). Os tipos de calibração avaliados foram a calibração com padrões aquosos, a calibração com adição padrão e a calibração com ajuste de matriz, onde foi utilizado óleo mineral para simular a matriz do biodiesel. Os autores verificaram que, para todos os analitos, a sensibilidade para a curva de calibração obtida a partir de padrões aquosos foi de 20 a 50% superior à observada para as curvas de calibração com adição padrão e com ajuste de matriz, indicando que esta não era uma alternativa adequada para a determinação dos analitos. Por outro lado, a curva de calibração com ajuste de matriz mostrou-se satisfatória, pois permitiu uma maior

frequência analítica quando comparada à calibração por adição padrão. Os sinais dos analitos nas microemulsões foram monitorados por 120 min e não foi observada variação significativa dos mesmos durante este período.

O uso da microemulsão como método de preparo de amostra de biodiesel também foi estudado por Amais e colaboradores¹⁰⁴, onde foi feita a determinação de Ca, Mg e Zn por F AAS. Os autores propuseram o uso da nebulização discreta como alternativa à nebulização contínua, devido à maior precisão dos resultados e sensibilidade dos analitos. Para a formação da microemulsão foram misturados 1 mL de biodiesel, 8 mL de *n*-propanol, 500 µL de HNO₃ (20% v/v) e 500 µL de Triton X-100. A mistura foi agitada em vórtex por 2 min para completa homogeneização. Igualmente aos demais estudos já citados, a estabilidade das emulsões foi verificada através do sinal dos analitos, que se manteve constante por até 8 h. Os LDs obtidos foram 0,11, 0,03 e 0,08 mg L⁻¹ para Ca, Mg e Zn, respectivamente.

A formação de emulsões de amostras combustíveis também foi amplamente estudada para a quantificação de elementos traço em matrizes de origem fóssil. Luz e colaboradores¹⁰⁵ estudaram a determinação de Co, Cu, Pb e Se em diesel, gasolina e óleo bruto por GF AAS. A formação das emulsões foi avaliada a partir de óleo bruto, em virtude de sua maior complexidade em relação às demais matrizes. Foram avaliadas massas de óleo de 100 a 1000 mg, para emulsões preparadas com hexano, Triton X-100 e água. Os autores verificaram que emulsões formadas com 100, 300, 400, 500 e 1000 mg de óleo permaneciam estáveis por 120, 30, 20, 10 e 2 min, respectivamente, enquanto que emulsões com 200 mg de óleo permaneciam estáveis por até 8 h, possivelmente devido à quantidade de ácidos naftênicos presentes na amostra que podem agir como co-surfactante. Contudo, com o objetivo de garantir maior sensibilidade, os autores optaram por usar 400 mg de amostra. Também foi avaliada a ordem das etapas envolvidas na formação da emulsão. Os autores observaram que a sonicação deveria ser feita antes da etapa de diluição em água, caso contrário emulsões estáveis não eram obtidas. Dessa forma, a melhor condição encontrada foi preparar a emulsão a partir de 400 mg de amostra, 125 µL de hexano (empregado somente para a amostra de óleo bruto) e 7,5 mL de Triton X-100 (20% m/v), que foi submetida a um banho de US por 30 min e subsequentemente diluída em água até um volume final de 25 mL. Para a determinação dos analitos por

GF AAS, as temperaturas de pirólise foram mantidas em 200 e 1300 °C, e a de atomização em 2250 °C. A adição de 20 µL de Pd como modificador químico foi essencial para promover a estabilidade térmica dos analitos, principalmente a do Se. Os LDs alcançados variaram de 0,02 a 0,11 µg g⁻¹.

Empregando a microemulsão como forma de estabilização de amostras, Brandão e colaboradores¹⁰⁶ propuseram um método para a determinação de Mn em produtos petroquímicos por GF AAS. Amostras de diesel, gasolina e nafta foram estabilizadas como microemulsões mediante *n*-propanol e HNO₃ nas proporções 5,9:4,0:0,1, 6,7:3,2:0,1 e 6,6:3,3:0,1, respectivamente. As concentrações respectivas de HNO₃ foram 45, 40 e 75%. Os autores verificaram que o sinal do Mn decaía de modo exponencial para amostras analisadas de forma direta durante um período de 5 dias. Por outro lado, quando as amostras eram estabilizadas na forma de microemulsão, o sinal do Mn se mantinha constante por, pelo menos, 20 dias. Em adição, os autores observaram que o uso de modificadores químicos, além de não proporcionar aumento da estabilidade térmica e atenuação do sinal de fundo, levava à quebra da microemulsão.

Embora as microemulsões tenham sido amplamente estudadas no preparo de amostras de biocombustíveis e combustíveis, poucos trabalhos destinam atenção à formação e à caracterização das emulsões. Geralmente, nos trabalhos publicados são citadas emulsões formadas por quantidades pré-definidas de amostra e surfactante, sem caracterização do diâmetro das gotas dispersas, empregando equivocadamente o termo microemulsão.

2.4 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE (GF AAS)

Dentre as técnicas analíticas disponíveis para a análise de contaminantes inorgânicos em combustíveis e biocombustíveis, a GF AAS é uma das técnicas mais empregadas, pois, devido à sua alta sensibilidade, possibilita a determinação de elementos presentes em baixa concentração, a nível de ppb. Diferentemente das técnicas de ICP, a GF AAS permite a análise direta de amostras líquidas com alto teor de matéria orgânica, como é o caso dos combustíveis, diminuindo o tempo de preparo da amostra e os riscos de contaminação e perda de analito. Além disso, pequena quantidade de amostra é requerida para a análise, da ordem de µL.¹³

A técnica GF AAS baseia-se no princípio de absorção atômica, em que os átomos, presentes em seu estado fundamental, interagem com a radiação eletromagnética e são promovidos a um estado excitado através da absorção de energia.¹⁰⁷ Para que ocorra o fenômeno de absorção atômica, é necessário que a amostra seja vaporizada a altas temperaturas e seja decomposta na forma de átomos no estado gasoso. Esse processo é conhecido como atomização e pode ocorrer em uma chama ou em um forno aquecido eletricamente, chamados de atomizadores. No caso da GF AAS, o atomizador utilizado é um forno de grafite, conforme mostrado na Figura 3.¹⁰⁸

Ao longo dos anos, várias melhorias foram feitas no atomizador de grafite a fim de contornar as interferências observadas, tais como: *i)* alta taxa de aquecimento, garantindo maior densidade de átomos no estado vapor; *ii)* aquecimento do tubo de forma transversal, eliminando problemas de condensação e recombinação provenientes do gradiente de temperatura; *iii)* operação isotérmica, alcançada através da inserção da plataforma de L'Vov, onde foi possível assegurar a equivalência de temperatura entre a fase vapor e a plataforma; *iv)* recobrimento do tubo com grafite pirolítico, diminuindo a porosidade e a tendência de formação de carbetos.¹⁰⁹

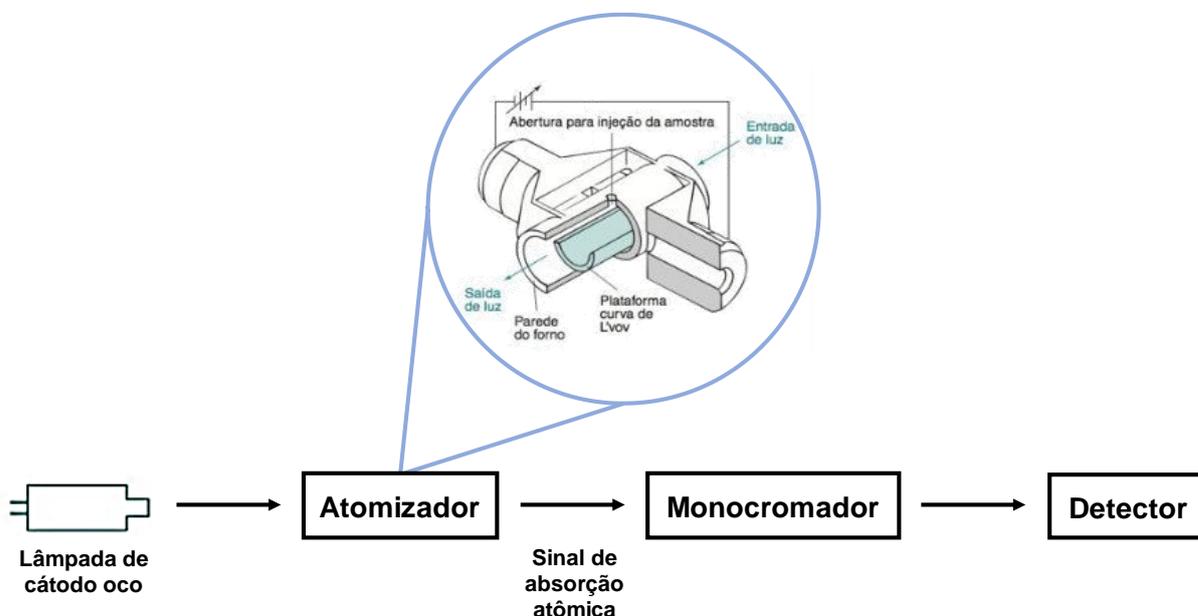


Figura 3. Diagrama esquemático do princípio de absorção atômica e atomizador de forno de grafite. Adaptado de Harris.¹⁰⁸

Diversas recomendações para um melhor desempenho da GF AAS foram reunidas por Slavin e colaboradores, que estabeleceram o conceito STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*). Além das modificações acima citadas, as recomendações incluem o uso de modificadores químicos, a aquisição do sinal analítico em absorvância integrada e o uso de um sistema de correção de fundo, tal como o efeito Zeeman.¹⁰⁹

Uma vez que a amostra é introduzida no tubo de grafite, inicia-se um programa de aquecimento que consiste de, no mínimo, quatro etapas divididas em secagem, pirólise, atomização e limpeza. Os parâmetros de cada etapa, como temperatura, taxa de aquecimento e duração, devem ser preferencialmente otimizados para que se obtenha a melhor sensibilidade, preservando as condições do atomizador.¹¹⁰

A etapa de secagem tem como objetivo principal a eliminação do solvente. Nessa etapa, as temperaturas são ligeiramente maiores que a temperatura de ebulição do solvente e há fluxo de gás de arraste no interior do tubo de grafite, a fim de evitar que haja recondensação do solvente nas partes mais frias do tubo. Além de perdas na precisão e exatidão dos resultados, a recondensação do solvente pode levar à perda da vida útil do atomizador. Adicionalmente, a taxa de aquecimento deve ser relativamente baixa, a fim de evitar projeção da amostra para a parte externa do atomizador. Na pirólise, o objetivo principal é a eliminação dos componentes voláteis da matriz sem perdas do analito por volatilização. O tempo e a temperatura de pirólise irão depender do tipo de amostra, da estabilidade térmica do analito e das características oxidantes/redutoras do meio. Assim como na secagem, é mantido um fluxo de gás inerte, normalmente argônio, a fim de carrear todos os vapores gerados para fora do tubo. Em alguns casos, quando há deposição de carbono no atomizador, é possível que o argônio seja substituído por ar ou oxigênio; entretanto, o tempo de vida útil do atomizador é bastante reduzido e a temperatura de pirólise deve ser limitada a 500 °C. Na etapa de atomização é onde as moléculas que contém o analito serão decompostas, gerando átomos livres no estado fundamental e na forma de vapor aptos a absorverem a radiação emitida pela fonte. Nesse caso, o fluxo de gás no interior do tubo de grafite é cessado durante a atomização para garantir uma maior concentração de átomos no estado vapor e, conseqüentemente, uma maior sensibilidade. Por fim, na etapa de limpeza são eliminados quaisquer resíduos da amostra que não foram volatilizados nas etapas prévias de aquecimento.^{110,111}

Para a definição das condições de pirólise e atomização, são construídas curvas que relacionam o sinal de absorvância com a temperatura, onde as condições ótimas são escolhidas com base na máxima sensibilidade e no perfil do sinal analítico. Contudo, tal otimização só pode ser feita para elementos que volatilizam totalmente na etapa de atomização. Elementos refratários ou extremamente voláteis, devido à sua natureza e comportamento térmico, são atomizados ou em temperaturas excessivamente altas ou durante a etapa de pirólise e, por essa razão, faz-se necessária a presença de modificadores químicos.^{111,112} Modificadores químicos são substâncias adicionadas às amostras e padrões que tem como objetivo aumentar a estabilidade térmica do analito ao mesmo tempo em que diminui a estabilidade térmica da matriz, promovendo a completa separação de ambos durante a etapa de pirólise.¹¹⁰ Um modificador químico ideal deve ser capaz de estabilizar o maior número possível de elementos, sem aumentar os sinais de fundo e do branco analítico, e sem diminuir o tempo de vida útil do atomizador.¹¹²

Além do aumento de sensibilidade, um programa de aquecimento com temperaturas de pirólise e atomização adequadas é fundamental, pois colabora para o desenvolvimento de metodologias livres de interferências, melhorando a exatidão dos resultados. As interferências encontradas na técnica GF AAS são classificadas como espectrais (emissão e absorção) e não-espectrais (físicas e químicas). Nas interferências espectrais por emissão, o detector recebe radiação que não a emitida pela fonte, gerando um resultado inferior ao real. A emissão de radiação pode se dar por moléculas, átomos ou pelas próprias paredes do forno de grafite. Já nas interferências por absorção, o detector recebe menos radiação que a real, obtendo-se resultados superestimados. Interferências por sobreposição de linhas atômicas são raras nesse caso; todavia, podem ser verificadas absorções por moléculas diatômicas, como PO, CN e C₂, tanto de forma contínua quanto de forma estrutural. Ademais, podem ser observadas interferências por espalhamento causadas pela presença de sólidos no tubo de grafite durante a aquisição do sinal.

As interferências não-espectrais físicas ocorrem quando há perdas do analito por: *i*) volatilização; *ii*) vaporização incompleta do analito, ocasionada por uma limpeza ineficiente do atomizador, levando a efeitos de memória, ou pela migração do analito na superfície do grafite; *iii*) mudanças no comportamento do analito, como variação da taxa de difusão e redução no tempo de residência dos vapores no atomizador. As

interferências químicas, por sua vez, se dão quando há a formação de compostos (óxidos, cloretos, sulfetos) com o analito, seja na fase vapor seja na fase condensada, impedindo que o elemento atomize para a absorção da radiação.^{110,112}

As formas de contornar as interferências espectrais podem ser através da correção do sinal de fundo ou da escolha de uma linha espectral alternativa. Visto que a maioria dos elementos não possui uma linha de absorção secundária, é comum que sejam empregados sistemas de correção de fundo. Na GF AAS, o corretor de fundo mais utilizado é o baseado no efeito Zeeman, pois, por meio da aplicação de um campo magnético, consegue corrigir inclusive os sinais de fundo estruturais e os provocados por espalhamento de luz, principal inconveniente da técnica. As interferências não-espectrais, por outro lado, podem ser contornadas de diferentes formas, que incluem a utilização de um atomizador adequado, com recobrimento pirolítico e plataforma de L'Vov, o cumprimento das condições STPF e o uso de modificadores químicos.¹¹³

São vários os parâmetros que conferem vantagem da GF AAS frente à F AAS. Embora o tempo de análise requerido na GF AAS seja alto, da ordem de minutos, a sensibilidade alcançada é bastante superior à da F AAS, em razão do maior tempo de residência dos vapores no atomizador, das dimensões reduzidas do forno de grafite, da maior eficiência de transporte da amostra e da suspensão do fluxo de gás no tubo de grafite durante a atomização.¹¹² Comparada a técnicas como F AAS, ICP OES e ICP-MS, que utilizam a nebulização pneumática como meio de introdução da amostra, a GF AAS é menos dependente das propriedades físicas da solução. Além disso, a técnica permite a análise de emulsões, suspensões ou de forma direta de matrizes com alto teor de matéria orgânica, em virtude de um programa de aquecimento otimizado que viabiliza a completa eliminação da matriz anteriormente à atomização do analito. Em contrapartida, a GF AAS é uma técnica monoelementar e, portanto, sua utilização é inviabilizada em metodologias que exigem a determinação de múltiplos analitos.^{13,113}

Saint'Pierre e colaboradores⁶⁰ avaliaram o uso da análise direta para a determinação de As, Cu, Fe, Pb, Sb e Sn em etanol combustível por GF AAS. Previamente às análises, as amostras precisaram ser acidificadas através da adição de HNO_3 4 mol L^{-1} na proporção 10% v/v, a fim de garantir a estabilidade dos sinais analíticos e a conversão das espécies organometálicas às inorgânicas. As

temperaturas de pirólise foram 1300, 1300, 1300, 1200, 1200 e 1400 °C e as de atomização foram 2200, 2300, 2400, 2000, 2200 e 2100 °C para As, Cu, Fe, Pb, Sb e Sn, respectivamente. Rutênio foi utilizado como modificador permanente para As, Pb, Sb e Sn. As concentrações de Cu e Fe, nas nove amostras de etanol combustível avaliadas no estudo, variaram de 2,15 a 13,9 e de 6,88 a 29,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Já as concentrações de As, Pb, Sb e Sn foram inferiores a 0,7, 0,7, 1,8 e 3,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, cujos valores representam os LDs do método.

Também empregando a técnica GF AAS para análise de biocombustíveis, Dutra¹¹⁴ estudou, em sua dissertação de mestrado, a determinação de Cu e Ni em biodiesel após preparo das amostras por MW-AD. Para a digestão de 500 mg de amostra, foi empregada como solução digestora uma mistura de 3 mL de HNO_3 , 2 mL de H_2O_2 e 1 mL de H_2O . O programa de aquecimento consistiu de três etapas: *i*) rampa de 15 min até 1500 W; *ii*) permanência por 40 min a 1500 W; *iii*) resfriamento por 20 min a 0 W. As temperaturas de pirólise foram 1000 e 1100 °C para Cu e Ni, respectivamente, enquanto as temperaturas de atomização foram 2000 e 2300 °C, respectivamente. Os LQs alcançados para o método proposto foram 41,2 ng g^{-1} para Cu e 11,2 ng g^{-1} para Ni. Para ambos os analitos, as concentrações encontradas na amostra foram abaixo do LQ, possivelmente devido à baixa concentração dos elementos e aos altos valores de brancos atingidos com o uso de H_2O_2 .

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de Cr e Cu em bio-óleo após preparo das amostras por microemulsão e quantificação dos analitos por GF AAS.

Os objetivos específicos foram:

- I. Otimização do preparo das amostras na forma de emulsão através da construção de diagramas de fases ternários para Triton X-100 e *n*-propanol;
- II. Caracterização das emulsões a partir da determinação do tamanho das gotas mediante a técnica de espalhamento dinâmico de luz;
- III. Otimização do programa de aquecimento da técnica GF AAS através da construção das curvas de pirólise e atomização;
- IV. Avaliação da estabilidade dos analitos nas microemulsões;
- V. Avaliação de interferências causadas por efeito de matriz nas microemulsões;
- VI. Quantificação de Cr e Cu em quatro amostras de bio-óleo por GF AAS;
- VII. Avaliação das figuras de mérito do método proposto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para a caracterização das amostras, foi empregado um espectrômetro de infravermelho (Nicolet 6700 FTIR, Thermo Fischer Scientific), operado no modo ATR, com cristal de germânio (Ge) e resolução de 4 cm^{-1} . A determinação do teor de água foi feita pelo método Karl Fischer, por meio de titulador automático (905 Titrand, Methrom) equipado com agitador automático (803 Stirrer) e eletrodo de platina.

Uma chapa de aquecimento (AA-840, Gehaka) e um agitador vórtex (WIZARD IR Infrared vortex mixer, Velp Scientifica) foram usados para a homogeneização das amostras. No estudo referente à construção dos diagramas de fases ternários foram utilizados um agitador vórtex (Velp Scientifica) e uma centrífuga (Baby I Centrifuge, Fanem). Ultrassom do tipo sonda (VCX500, Sonic & Materials) com potência de 500 W e frequência de 20 KHz equipado com ponteira de 2 mm de diâmetro e volume de 0,2-5 mL foi utilizado nos ensaios das emulsões. Todas as amostras e soluções foram pesadas em balança analítica (XS105 Dual Range, Mettler Toledo) com precisão de 0,01 mg e capacidade máxima de 120 g.

A determinação do diâmetro hidrodinâmico das gotas das emulsões foi feita através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), empregando o equipamento ZetaSizer Nano S90 (Malvern Instruments), com feixe He-Ne (633 nm) e detector fixo a 90° . As emulsões foram diluídas em água purificada previamente às análises e as medidas foram realizadas a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Cromo e Cu foram determinados por meio de um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) (PinAAcle 900T, Perkin Elmer), equipado com tubo de grafite aquecido transversalmente e corretor de fundo baseado no efeito Zeeman. A introdução das amostras e soluções de referência no tubo de grafite foi executada por meio de um auto-amostrador (AS900, Perkin Elmer), com volume pré-determinado de 20 μL . Como fonte de radiação, foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco operadas com correntes de 25 e 15 mA para Cr e Cu, respectivamente. As linhas atômicas selecionadas para Cr e Cu foram 357,87 e 324,75 nm, respectivamente. A largura da fenda espectral foi mantida em 0,7 nm e o tempo de integração do sinal de absorbância em 5 segundos. Todas as medidas foram feitas

em absorvância integrada. Os programas de temperatura otimizados para a determinação de Cr e Cu estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Programas de temperatura para a determinação de Cr e Cu por GF AAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)	Vazão de Ar (mL min ⁻¹)
Secagem 1	110	30	5 ^a , 10 ^b	250
Secagem 2	150	15	30	250
Pirólise	1400 ^a , 700 ^b	10	20	250
Atomização	2100 ^a , 2000 ^b	0	5	0
Limpeza	2250 ^a , 2200 ^b	1	3	250

^a Cromo ^b Cobre

Como forma de avaliar a exatidão dos resultados obtidos para as amostras preparadas na forma de microemulsão, as amostras de bio-óleo foram também submetidas à digestão ácida. Para tanto, um forno micro-ondas (MultiwavePRO, Anton Paar) com potência máxima de 1500 W, equipado com 8 frascos de quartzo com volume interno de 80 mL e limites de pressão e temperatura de 80 bar e 280 °C, respectivamente, foi utilizado.

Um destilador *sub-boiling* (Distillacid, Berghof) foi destinado à purificação do ácido nítrico empregado na digestão e na descontaminação dos materiais. Para as análises estatísticas e a construção dos gráficos apresentados neste trabalho, o programa Origin 7.0 foi utilizado.

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para a determinação do teor de água nas amostras, foram utilizadas as soluções Karl Fischer CombiTitrant 5, como reagente titulante, e Combimetanol com concentração máxima de 0,01% de água, como solvente. Ambos os reagentes foram da marca Merck.

Água ultrapura, purificada através do sistema Milli-Q (Elix, Merck Millipore) com resistividade final de 18,2 MΩ.cm, foi usada no preparo das soluções e emulsões. No preparo das emulsões foram utilizados Triton X-100 e *n*-propanol, ambos da marca Synth. As soluções de calibração foram preparadas a partir da solução estoque

contendo 1000 mg L⁻¹ de Cr (LGC Standards) e Cu (Absolute Standards Inc) em meio aquoso. Pelo menos cinco soluções de referência foram utilizadas na construção das curvas de calibração, cujo intervalo variou de 0,05 a 0,4 ng para Cr e Cu. Para os testes de modificador químico, foi utilizada uma solução de Pd(NO₃)₂ preparada a partir da diluição da solução estoque contendo 10 g L⁻¹ de Pd (Merck). Como gás de arraste e de proteção na determinação de Cr e Cu por GF AAS foi utilizado argônio (White Martins) com pureza de 99,999%.

Ácido nítrico (HNO₃, 65% m/m) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 30% m/m), ambos da marca Merck, foram empregados na digestão das amostras. Antes do uso, o HNO₃ foi purificado mediante destilação abaixo do seu ponto de ebulição.

Todo o material usado no trabalho foi descontaminado em banho de HNO₃ 10% (v/v) por, aproximadamente, sete dias e depois lavado três vezes com água purificada antes do uso.

4.3 AMOSTRAS E MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO

Para o desenvolvimento do método, foram utilizadas quatro amostras de bio-óleo gentilmente cedidas pelos professores Alberto Wisniewski Jr (UFS) e João Otávio Trierweiler (UFRGS). A relação das amostras está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Relação das amostras de bio-óleo estudadas neste trabalho.

Amostra	Biomassa
A1	Esterco bovino
A2	Couro curtido em Cr
A3	Couro curtido em tanino vegetal
A4	Pele sem curtimento

As amostras A2, A3 e A4 foram coletadas diretamente após o processo de pirólise, sendo compostas por fase orgânica e fase aquosa; a amostra A1 sofreu processo de extração líquido-líquido com tetrahydrofurano (THF) e, portanto, apresenta a fase orgânica em abundância. O aspecto visual das amostras é ilustrado na Figura 4.

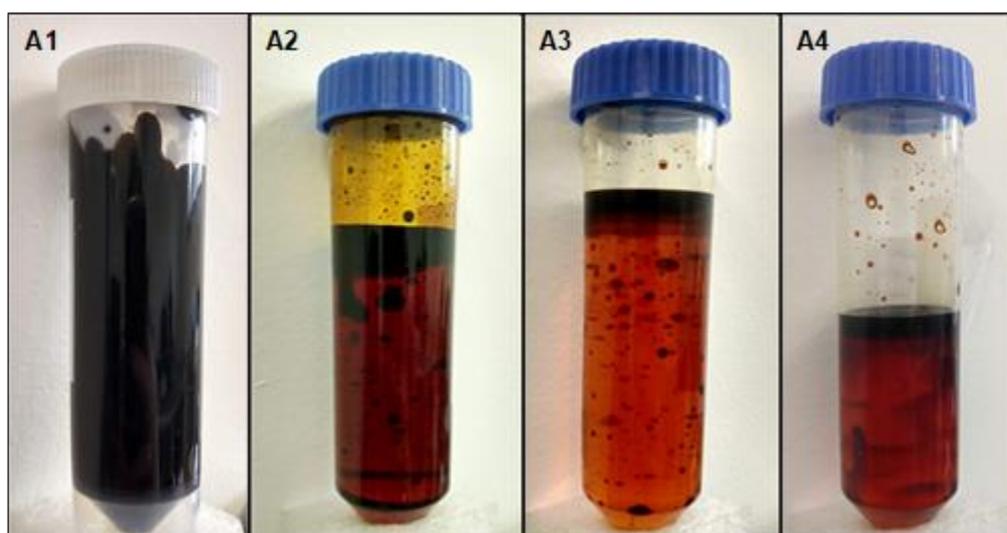


Figura 4. Aspecto visual das amostras de bio-óleo utilizadas neste trabalho.

As amostras foram homogeneizadas previamente às análises através de banho de aquecimento a 70 ± 5 °C por 30 min, com agitação em vórtex a 1600 rpm por 30 s a cada 15 min para garantir completa homogeneização. Para a avaliação da homogeneidade e determinação do teor de água das amostras, foram transferidas para o vaso do titulador Karl Fischer, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* de polipropileno e mediante pesagem por diferença, 25 a 50 mg de bio-óleo após homogeneização.

Para a construção dos diagramas de fases ternários e as otimizações envolvendo a determinação dos analitos por GF AAS foi selecionada a amostra A2, devido à sua maior disponibilidade e à presença de Cr na biomassa utilizada para a sua produção.

A exatidão do método proposto foi verificada através da análise do material de referência certificado (CRM) HU-1 *used oil* (SCP Science).

4.4 PREPARO DA AMOSTRA

4.4.1 Microemulsão

Uma solução de Triton X-100 em água (10% v/v) e *n*-propanol foram testados como emulsificantes no preparo das microemulsões. Para a construção dos diagramas de fases ternários, foram preparadas 9 misturas binárias de bio-óleo e emulsificante com proporções mássicas pré-estabelecidas e massa final de 2 g. Em

cada mistura, as massas de amostra e emulsificante variaram em 10%, sendo a primeira mistura composta por 90% de bio-óleo e 10% de emulsificante, e a última mistura composta por 10% de bio-óleo e 90% de emulsificante. Cada mistura foi titulada gota a gota com água, agitada em agitador vórtex a 1200 rpm por 30 s e centrifugada a 717 g por 3 min. Esse procedimento foi conduzido até a mudança de comportamento da solução, seja formação de fase, separação de fase ou turbidez. Ao fim da titulação, o frasco foi pesado e anotada a massa de água adicionada. A partir das proporções mássicas de cada componente foram construídos diagramas de fases ternários.

A emulsão com maior contribuição da amostra em cada diagrama de fases ternário foi caracterizada através do tamanho de gota pela técnica de DLS. A composição adotada como ótima foi 56% de bio-óleo, 24% de *n*-propanol e 20% de água (44% A/O).

4.4.2 Digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)

A digestão, usada como método comparativo ao de preparo das amostras na forma de microemulsão, foi adaptada do método desenvolvido por Barela e colaboradores⁷⁸ para a decomposição de biodiesel. Para tanto, aproximadamente 500 mg de amostra de bio-óleo foi pesada por diferença com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* de polipropileno e transferida ao frasco de quartzo que acompanha o forno micro-ondas. Posteriormente, foram adicionados à amostra 5,5 mL de HNO₃ 2 mol L⁻¹ e 0,5 mL de H₂O₂ 30% (m/m). A mistura foi submetida a um programa de aquecimento de duas etapas: *i*) rampa de 20 min até 500 W; *ii*) permanência por 20 min a 500 W. Após resfriamento, as soluções foram transferidas a frascos de polipropileno e o volume aferido a 20 mL com água ultrapura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A discussão dos resultados está dividida em quatro partes. Na primeira, serão mostrados os resultados obtidos na caracterização das amostras, incluindo análises de infravermelho e Karl Fischer. Na segunda parte, será discutido o uso da microemulsão como método de preparo de amostra, onde serão abordados os procedimentos de preparo da microemulsão, como agitação manual e ultrassom, e os emulsificantes Triton X-100 e *n*-propanol. Também será discutida a caracterização das emulsões formadas.

Na terceira parte, serão apresentados e discutidos os resultados de otimização das condições operacionais do GF AAS, bem como a determinação de Cr e Cu nas amostras de bio-óleo. Também serão apresentados os resultados das avaliações de efeito de matriz e estabilidade dos analitos na microemulsão. Por fim, na quarta parte, serão discutidas as figuras de mérito, as quais serão comparadas com as relatadas em trabalhos prévios relacionadas à determinação de Cr e Cu em combustíveis.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Considerando a composição química complexa do bio-óleo e as diferentes biomassas empregadas no processo de produção dos bio-óleos utilizados neste estudo, foi feita uma breve caracterização dessas amostras na tentativa de elucidar sua composição. Para tanto, os bio-óleos do presente estudo foram submetidos às análises por infravermelho e titulação Karl Fischer (KF).

Tendo em vista que os bio-óleos são líquidos compostos por duas fases imiscíveis (aquosa e orgânica), fez-se necessária a homogeneização das amostras previamente às análises a fim de garantir alíquotas com representatividade amostral, ou seja, com a mesma composição de toda a amostra.

O procedimento de homogeneização, descrito na seção 4.3, foi verificado através da determinação do teor de água por titulação KF, que será discutida na seção 5.1.2. Para avaliação da homogeneidade, foram coletadas alíquotas de amostra no topo e no fundo do recipiente. Os teores de água obtidos no topo e no fundo para a amostra A4, escolhida de forma aleatória, foram $60,5 \pm 0,8$ e $62,0 \pm 1,4\%$, respectivamente, considerando $n=3$. Com 95% de confiança, esses resultados não diferem significativamente (teste *t-student*).

Tal procedimento foi adotado no sentido de corroborar com a avaliação visual (análise qualitativa) das amostras após a homogeneização. Dessa forma, pode-se considerar válido o procedimento de homogeneização, que garantiu homogeneidade adequada das amostras.

5.1.1 Infravermelho

Com o objetivo de comparar quimicamente os diferentes bio-óleos utilizados no presente estudo, as amostras A2, A3 e A4 foram submetidas a análises de espectroscopia na região de infravermelho (Figura 5). A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica simples e rápida que, por meio dos fenômenos moleculares de vibração e rotação, permite identificar uma diversidade de grupamentos funcionais orgânicos.¹⁰⁷

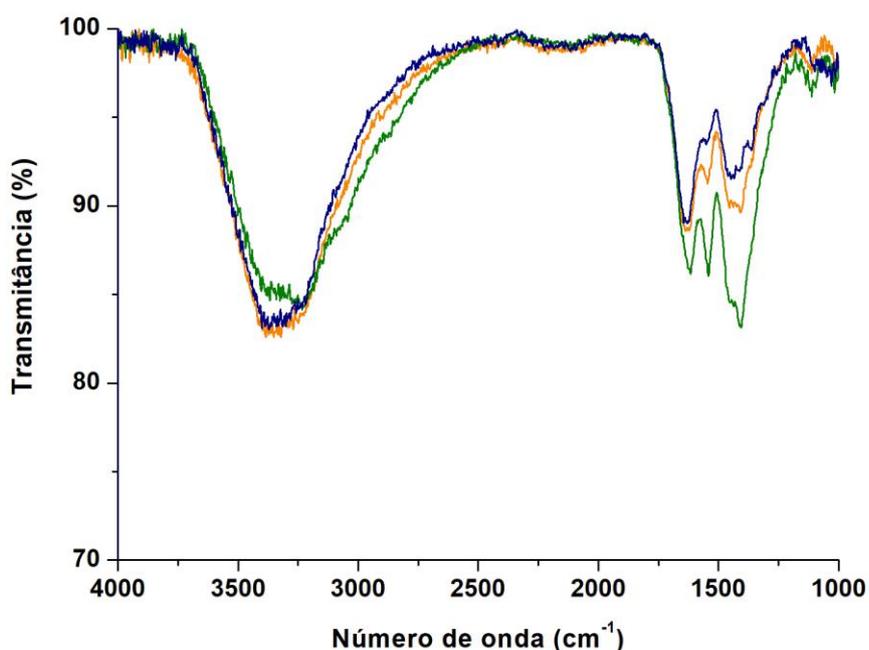


Figura 5. Análises das amostras A2 (—), A3 (—) e A4 (—) por FTIR.

Através das análises por FTIR foi possível identificar, nas três amostras estudadas, uma ampla banda entre 2750 e 3600 cm^{-1} . Essa banda corresponde à sobreposição de três fenômenos vibracionais: estiramento O–H entre 3200 e 3600 cm^{-1} , presente em álcoois, ácidos carboxílicos e água; estiramento C–H de alkenos e aromáticos entre 3010 e 3100 cm^{-1} ; estiramento C–H de alcanos entre 2850 e 2970 cm^{-1} . Essa sobreposição pode ser comprovada ao analisarmos o perfil da

banda de transmissão da amostra A4, que apresenta uma leve deformação em 3000 e 3200 cm^{-1} , referente às transições entre os estiramentos observados.

Em menores energias são observadas bandas referentes ao estiramento C=O, presente em ácidos carboxílicos, aldeídos, cetonas e ésteres, que podem variar entre 1690 e 1760 cm^{-1} a depender do ambiente químico, seguidas por uma banda em 1500 cm^{-1} , aproximadamente, correspondente ao estiramento C=C de alcenos e aromáticos. Por fim, são verificadas bandas em números de onda menores que 1500 cm^{-1} , relacionadas à deformação angular C–H de alcanos (1350-1470 cm^{-1}) e ao estiramento C–O (1050-1300 cm^{-1}) de álcoois e éteres.^{107,115}

Para as três amostras de bio-óleo analisadas, as bandas correspondentes à deformação angular C–H de alcanos foram mais intensas que a banda relacionada ao estiramento C=C. Isso indica que os bio-óleos estudados no presente trabalho têm potencial para serem utilizados como biocombustíveis após o seu melhoramento, uma vez que possuem em sua composição compostos alifáticos que são primordiais na composição química da gasolina e do diesel.¹¹⁶

Comparando os três espectros de FTIR, observa-se que os bio-óleos A2 e A3 assemelham-se parcialmente, enquanto que o bio-óleo A4 apresenta maior distinção dos demais. Isto se deve, provavelmente, ao tratamento dado à biomassa utilizada para a produção desses bio-óleos, uma vez que os bio-óleos A2 e A3 foram produzidos a partir de couros submetidos a diferentes métodos de curtimento, e o bio-óleo A4 foi produzido a partir de pele crua sem tratamento prévio. As análises por FTIR demonstram que, apesar do processo de pirólise para a produção dos bio-óleos ser o mesmo, a constituição da biomassa e o seu tratamento são também fatores determinantes para a composição final dos bio-óleos. Cabe mencionar que os espectros FTIR obtidos no presente estudo foram semelhantes aos já relatados para outras amostras de bio-óleo.^{35,117}

Para a amostra A1 não foi possível realizar a análise por FTIR. Isso se deve ao fato de a limpeza do cristal ser feita apenas com solvente, normalmente água ou álcoois de cadeia curta. Como a amostra não era solúvel em etanol, solvente utilizado na limpeza do cristal no laboratório responsável pelo equipamento FTIR, optou-se por não analisar a amostra A1 devido à possibilidade de contaminar o cristal e comprometer futuras análises.

5.1.2 Teor de água

A determinação do teor de água nas amostras de bio-óleo é de extrema relevância, uma vez que a água (ou solução aquosa) é um dos principais componentes das emulsões. Dependendo da biomassa e dos parâmetros utilizados no processo de pirólise, bio-óleos com diferentes teores de água podem ser produzidos, levando à obtenção de emulsões de diversas composições e propriedades físico-químicas.

O método utilizado para a determinação do teor de água nas amostras foi o recomendado na norma ASTM E203 (*Standard Test Method for Water Using Volumetric Karl Fischer Titration*), cujo princípio é a potenciometria. Como solvente, utilizou-se metanol para as amostras A2, A3 e A4 e uma mistura de tolueno e metanol na proporção 3:1 para a amostra A1, devido à sua insolubilidade em metanol puro. Os teores de água obtidos nas amostras estão reportados na Tabela 3.

Tabela 3. Teor de água encontrado nas amostras de bio-óleo após titulação Karl Fischer (n=3).

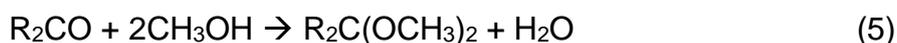
Amostra	Teor de H ₂ O (%)
A1	54,4 ± 6,0
A2	78,5 ± 0,6
A3	78,6 ± 0,5
A4	60,5 ± 0,8

Como pode ser verificado na Tabela 3, os teores de água encontrados nas amostras de bio-óleo foram significativos e são superiores aos já reportados na literatura. Para a grande maioria dos bio-óleos, o conteúdo de água varia de 15 a 30%, podendo ser proveniente da própria biomassa ou de reações de desidratação que ocorrem durante a pirólise.^{19,24} Contudo, a depender das condições reacionais do processo de pirólise e do tipo e do pré-tratamento da biomassa, teores de água superiores a 50% podem ser encontrados.^{19,31}

Os altos percentuais de água encontrados nas amostras de bio-óleo utilizadas no presente estudo podem estar relacionados com as características da sua produção, conforme já mencionado, como também à estocagem. Os aldeídos e cetonas gerados durante a pirólise e que constituem o bio-óleo final podem sofrer

reações de condensação e desidratação durante a estocagem a longo prazo, produzindo água como sub-produto.²⁴

Reações paralelas que podem ocorrer durante a titulação KF também contribuem para o aumento do teor de água no meio, interferindo no resultado final. Os bio-óleos constituem-se de uma enorme variedade de compostos orgânicos oxigenados, tais como ácidos carboxílicos, aldeídos e cetonas. Na presença de álcoois, como o metanol, esses compostos reagem para a formação de ésteres (3), cetais (4) e acetais (5), formando água como produto secundário.^{118,119}



Como forma de contornar esse problema, pode-se aumentar o pH do meio durante a titulação, uma vez que as reações paralelas acima mencionadas, na presença de metanol, são favorecidas em meio ácido. Por outro lado, a constante de velocidade da reação KF, além de sofrer influência da temperatura, também é influenciada pelo pH. Dessa forma, em pH maior que 8 a ocorrência de reações interferentes, na presença do titulante KF, é intensificada devido ao aumento das taxas reacionais. Uma outra possibilidade é utilizar, como solvente e reagente titulante, soluções livres de metanol e preparadas com álcoois de cadeia longa, a fim de diminuir ou impossibilitar as reações paralelas devido ao impedimento estérico gerado. Contudo, essas soluções são de custo extremamente elevado.^{118,120}

A fim de verificar a magnitude das interferências na titulação KF, o teor de água nas amostras de bio-óleo também foi investigado gravimetricamente, onde foi considerada a perda de massa das amostras após secagem em estufa a 100 °C. Para a análise, foram escolhidas as amostras A1 e A3 que continham teores de água distintos segundo a titulação KF.

Através da perda de massa, os teores de água encontrados foram $43,3 \pm 5,3$ e $94,5 \pm 0,3\%$ para as amostras A1 e A3, respectivamente. Embora esses resultados sejam inconclusivos no que se refere ao exato teor de água presente nas amostras, a diferença encontrada entre os métodos pode ser explicada pelo tratamento aplicado

ao bio-óleo. Enquanto que a fração aquosa foi extraída do bio-óleo A1 com o uso de THF, o bio-óleo A3 teve sua composição química mantida após o processo de pirólise. A extração com THF, além da retirada de água, também promove a remoção de compostos orgânicos de baixo peso molecular, como aldeídos e cetonas, que atuam como possíveis interferentes na titulação KF. Uma vez que o bio-óleo A3 não sofreu tratamento após a pirólise, todos os compostos orgânicos de baixo peso molecular, e por consequência, mais voláteis, foram eliminados no aquecimento juntamente com a água. Dessa forma, era esperado que o método por via seca levasse a resultados similares ou ligeiramente inferiores para a amostra A1 e superiores para a amostra A3.

Contudo, a titulação KF se mantém como uma técnica satisfatória para a determinação de água, uma vez que permite a sua quantificação em nível de ppm, de forma rápida e precisa. Embora existam diferentes métodos para a determinação de água, como a perda de massa recém mencionada, a cromatografia gasosa e a espectroscopia de infravermelho, outros inconvenientes podem ser encontrados. No caso da perda de massa, resultados superestimados podem ser observados em virtude da perda de componentes voláteis em temperaturas inferiores ou similar à de evaporação da água. Para o método baseado na cromatografia gasosa, além do alto custo relacionado à instrumentação e operação, a determinação direta de água é dificultada devido ao alargamento do pico cromatográfico, em função da forte adsorção da água na fase estacionária, e à instabilidade da fase estacionária. Já a determinação indireta de água, a qual é convertida em um composto mais compatível com os sistemas cromatográficos, dificulta sua determinação em baixos níveis de concentração em decorrência da pobre resolução. A espectroscopia de infravermelho, por outro lado, não se caracteriza como método primário para a quantificação de água, sendo necessário um método de referência, como os já citados nessa seção, para a criação de um modelo de calibração.¹¹⁸

Dessa forma, concluiu-se que, para amostras com tratamento prévio para retirada da fração aquosa, como no caso do bio-óleo A1, a determinação do teor de água pelos métodos KF e via seca provém resultados semelhantes. Já no caso de amostras brutas, como o bio-óleo A3, os teores de água obtidos pelos dois métodos são inconclusivos.

5.2 MICROEMULSÃO COMO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA

Ainda que o bio-óleo seja uma amostra líquida, seu tratamento prévio é indispensável, uma vez que suas propriedades físico-químicas, tais como densidade e viscosidade, diferem de maneira significativa de soluções aquosas que, geralmente, são requeridas na etapa de calibração do equipamento. Além disso, o bio-óleo, frequentemente, se apresenta em duas fases (aquosa e orgânica) que, na ausência de um emulsificante, não possuem estabilidade suficiente para a formação de emulsão de modo que permita a sua análise direta na etapa quantitativa. A diluição em solvente orgânico, embora seja uma alternativa viável como forma de preparo das amostras de bio-óleo, apresenta problemas de solubilidade, toxicidade e estabilidade dos analitos, além de dificuldades na manipulação e calibração do equipamento.¹³

Sendo assim, a formação de microemulsões de bio-óleo foi investigada neste trabalho através da construção de diagramas de fases ternários empregando *n*-propanol e Triton X-100 como emulsificantes. Também foi investigada a influência do ultrassom do tipo sonda na obtenção de microemulsões com maior massa de amostra. As emulsões foram caracterizadas quanto ao tamanho das gotas dispersas.

5.2.1 Diagramas de fases ternários

Com o objetivo de desenvolver um método de preparo de amostra simples e rápido para a determinação de contaminantes inorgânicos em bio-óleo, a formação de microemulsões estáveis e translúcidas foi estudada neste trabalho. Foram construídos diagramas de fases de três componentes, formados por água, bio-óleo e emulsificante. Cabe mencionar que a otimização de emulsões de combustíveis e biocombustíveis é pouco estudada na literatura, mas é de extrema relevância para a formação de emulsões com elevada razão massa/volume, fator essencial para evitar o efeito de diluição, potencializar o limite de detecção e, conseqüentemente, garantir a determinação de analitos em baixo nível de concentração nas amostras.

No presente estudo os emulsificantes *n*-propanol e Triton X-100 (10% v/v) foram selecionados com base na frequência de utilização em trabalhos prévios da literatura,^{14,79,121,122} bem como na intenção de se obter diferentes tipos de microemulsões, a partir de surfactantes com alto HLB, como o Triton X-100, e/ou álcoois de cadeia curta, como o *n*-propanol.

A construção dos diagramas de fases ternários foi baseada no método de titulação de fase, onde misturas de fase orgânica e surfactante são tituladas, sob agitação, com a fase aquosa até a alteração do meio por observação visual.⁹⁰ Para isso, foram preparadas misturas de bio-óleo e surfactante em diferentes proporções mássicas.¹²³ Às misturas, água foi pipetada até que se observasse mudança no aspecto visual, fosse turvação ou separação de fases. Como referência para a determinação do ponto final da titulação foi adotada a condição de uma solução homogênea e translúcida.

Dessa forma, o processo permite que toda a extensão de composições seja avaliada ao longo da titulação, obtendo-se os diagramas mostrados na Figura 6.

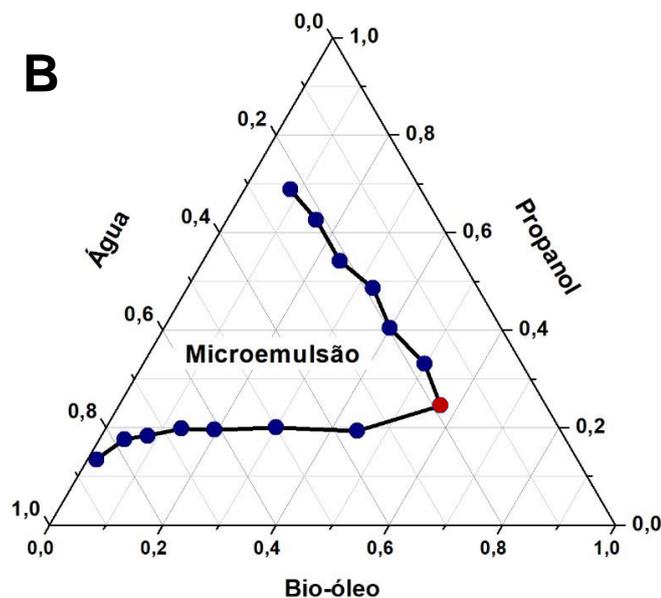
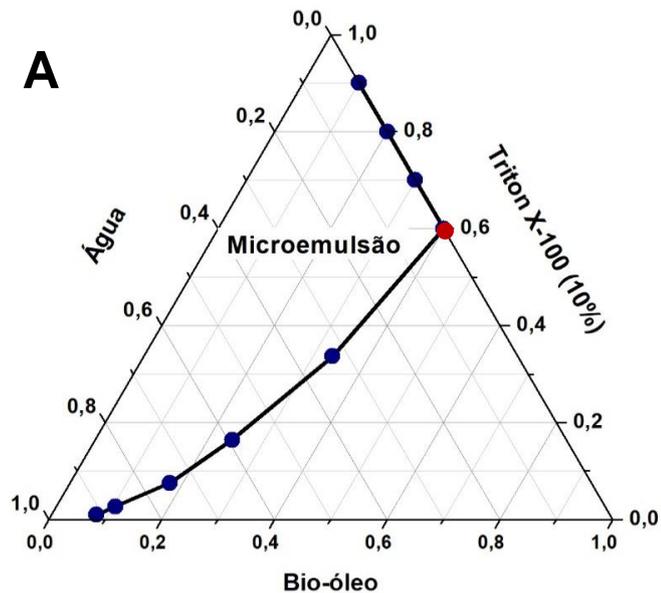


Figura 6. Diagramas de fases ternários obtidos para o uso de (A) Triton X-100 (10% v/v) e (B) *n*-propanol como emulsificantes.

Os diagramas de fases ternários, obtidos tanto para o uso de Triton X-100 como para o uso de *n*-propanol, apresentaram duas regiões distintas. A região delimitada pelos pontos em azul engloba a região de microemulsão, onde soluções estáveis e translúcidas podem ser obtidas. Já a região externa à microemulsão compreende soluções turvas e/ou de duas fases.

Segundo os diagramas A e B, a composição ótima, ou seja, aquela na qual a amostra está presente em maior concentração, representada pelo ponto em vermelho, foi 40% de bio-óleo e 60% de Triton X-100 (10% v/v), e 56% de bio-óleo, 24% de *n*-propanol e 20% de água, respectivamente. Todos os percentuais referem-se a frações massa/massa. Através desses resultados, podemos caracterizar as emulsões em: emulsão do tipo óleo em água (O/A), no caso do uso de Triton X-100 (10% v/v), e emulsão do tipo água em óleo (A/O), no caso do uso de *n*-propanol. Esses resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que surfactantes com baixos valores HLB, como o *n*-propanol (7,5), são mais lipofílicos e favorecem a formação de emulsões do tipo A/O, enquanto que surfactantes de alto valor HLB, como o Triton X-100 (13,4), são mais hidrofílicos e favorecem a formação de emulsões do tipo O/A.^{88,89}

Para ambas as emulsões, os resultados alcançados com a construção do diagrama de fases ternário são bastante significativos ao que se refere à massa de bio-óleo e volume de solução, fatores essenciais para a obtenção de melhores LD e LQ. Amais e colaboradores⁷⁹ desenvolveram um método para análise de biodiesel, matriz de maior similaridade ao bio-óleo, a partir de microemulsão com 0,5 mL de amostra de biodiesel, 0,25 mL de Triton X-100, 0,25 mL de HNO₃ 20% v/v e 4 mL de *n*-propanol. Já Lobo e colaboradores¹²⁴ propuseram o uso de 500 mg de biodiesel, 500 mg de Triton X-100 e HNO₃ 1% v/v até volume final de 50 mL. Em outra metodologia, também com base no preparo da amostra por microemulsão, para análise de diesel, gasolina e óleo bruto, Luz e colaboradores¹⁰⁵ utilizaram 400 mg de amostra, 125 µL de hexano (somente para o óleo bruto), 7,5 mL de Triton X-100 20% m/v e água até volume final de 25 mL. Em todos estes estudos foram preparadas emulsões com volumes de solução que acarretaram em diluições significativas, levando a concentrações de amostra, geralmente, menores que 10% m/m. Ademais, na análise por GF AAS, pouca quantidade de amostra é requerida, contribuindo para a menor geração de resíduos. Visto isso, as microemulsões de bio-óleo propostas no presente trabalho mostram-se vantajosas frente a outras já relatados na literatura, uma vez que concentrações de amostra de 40 e 56% puderam ser alcançadas através do uso de Triton X-100 (10% v/v) e *n*-propanol, respectivamente, sem geração de grandes quantidades de resíduos.

Embora a região de microemulsão abranja uma área significativa do diagrama de fases ternário relativo ao Triton X-100 (10% v/v), a relação mássica de bio-óleo na condição ótima é menor quando comparada à microemulsão preparada com *n*-propanol. Esses resultados demonstram que, para a determinação de contaminantes inorgânicos em baixa concentração, a microemulsão preparada com *n*-propanol (44% A/O, considerando 56% de óleo) apresenta vantagens frente à microemulsão preparada com Triton X-100 (40% O/A).

Devido à complexidade, às diferentes composições químicas e às variações do teor de água das amostras de bio-óleo, alguns ajustes precisaram ser feitos no preparo das emulsões. Para as amostras A2 e A3, que apresentaram teor de água semelhante, a emulsão otimizada a partir do diagrama de fases ternário, utilizando 560 mg de bio-óleo, foi escolhida. Já para a amostra A4, que apresentou um teor de água cerca de 18% inferior, a massa de bio-óleo precisou ser reduzida para 200 mg, uma vez que maiores quantidades de bio-óleo, apesar de formarem emulsão, não permaneciam estáveis por tempo suficiente para a realização das análises. A amostra A1, por outro lado, devido à sua complexidade e à extração a qual foi submetida para a retirada da fração aquosa, precisou ser solubilizada em solvente orgânico previamente à adição do emulsificante e da água, diferentemente das demais amostras. Nesse caso, só foi possível formar a emulsão com uma massa de bio-óleo de 50 mg solubilizada em 0,5 mL de THF.

5.2.2 Avaliação do efeito do ultrassom no aumento da massa de amostra

Com o objetivo de aumentar a massa de bio-óleo nas emulsões, foram feitos testes utilizando uma sonda de ultrassom (US) como fonte de energia. A capacidade de transferência de energia para o meio a partir do uso de uma sonda de US é maior quando comparada à transferência de energia alcançada através da simples agitação manual. A dissipação de ondas mecânicas na frequência do ultrassom promove agitação em nível molecular, que por sua vez, favorece a dispersão de líquidos imiscíveis para a formação de uma emulsão. A frequência do US, nesse caso 20 kHz, aliada à alta potência, 500 W, favorece a obtenção de menores tamanhos de gota e, conseqüentemente, a formação de emulsões com maior massa de óleo. Esse favorecimento ocorre devido ao fenômeno de cavitação, onde ciclos alternados de expansão e compressão das ondas ultrassônicas colapsam as bolhas da solução,

gerando microgotas. As microgotas, por sua vez, contribuem para a dispersão da fase dispersa na fase contínua, formando uma solução única homogênea, característica das emulsões. As emulsões geradas, bem como a estabilidade das mesmas, dependem do tempo de aplicação do ultrassom, do volume de mistura processado, da amplitude das ondas de ultrassom (intensidade) e do surfactante.^{125,126}

No presente trabalho foram avaliados o tempo de aplicação, 10 e 20 s, e a amplitude das ondas de ultrassom, 25 e 40%. Amplitudes maiores que 40% e menores que 20% não são permitidas pelo fabricante quando microponteiras (2 mm de diâmetro) são utilizadas. No entanto, por se tratar de um microprocessador, na aplicação de 20% de amplitude não ocorreu dissipação de energia ao meio, em razão da baixa potência enviada ao transdutor e, por essa razão, foi avaliada a amplitude de 25%. O volume total da mistura foi mantido em 0,5 mL, que está dentro da faixa permitida pelo fabricante e é um volume adequado para análises por GF AAS, sem geração de grande quantidade de resíduos. A ponteira de ultrassom foi sempre mantida no centro do recipiente, com distância adequada das paredes e do fundo.

As avaliações de tempo e amplitude foram feitas a partir de emulsões formadas com Triton X-100 (10% v/v), presente na concentração de 60%, e bio-óleo, presente na concentração de 40% (40% O/A), a melhor condição encontrada a partir do diagrama de fases ternário. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 7.

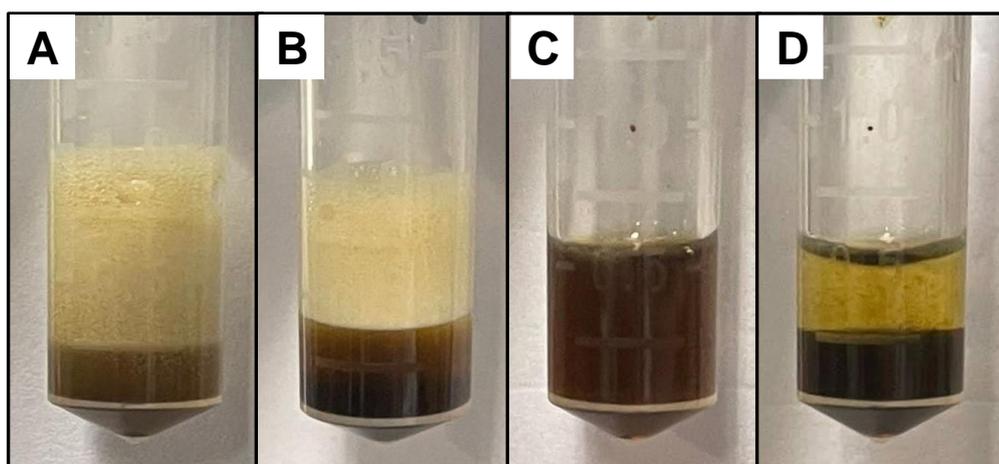


Figura 7. Avaliação do tempo de aplicação (s) e amplitude (%) do ultrassom na formação da emulsão, que foram: (A) 10 s e 40%; (B) 20 s e 40%; (C) 10 s e 25%; (D) 20 s e 25%.

Como pode ser observado nas imagens A e B da Figura 7, para 40% de amplitude houve formação de espuma em ambos os tempos de aplicação, 10 e 20 s,

respectivamente. Isto se deve à presença de um tensoativo forte, como o Triton X-100, onde não somente a tensão interfacial óleo-água é diminuída, como também a tensão interfacial ar-água. Essa diminuição da tensão interfacial facilita a inserção de ar na solução, gerando espuma. Quanto maior for a agitação do meio, ou, nesse caso, a intensidade das ondas de ultrassom, maior será a inserção de ar na solução. Ainda, o Triton X-100, que é um surfactante com propriedades detergentes, colabora para a geração de espuma. Dessa forma, estando presente em maior concentração na interface ar-água, a formação da emulsão é prejudicada e pode ser observada a separação das fases água e óleo, mesmo em um maior tempo de aplicação do US (imagem B). Esses resultados são indicativos de que, para um volume de 0,5 mL, a amplitude das ondas de ultrassom deve ser inferior a 40%.

Sendo assim, foi avaliada a amplitude de 25% em tempos de 10 e 20 s, cujos efeitos podem ser visualizados nas imagens C e D, respectivamente, da Figura 7. Como pode ser constatado, a diminuição da amplitude das ondas de ultrassom de 40 para 25% coibiu a geração de espuma, indicativo de baixas amplitudes são adequadas para pequenos volumes de solução. Em C, é possível que 10 s de sonicação são suficientes para a formação da emulsão, assegurando a obtenção de uma solução única e homogênea. Já para maiores tempos de sonicação, como 20 s, pode ser notado que há a separação das fases óleo e água. Isso se deve ao aumento das colisões entre as gotas, que aumentam ligeiramente a temperatura do meio e intensificam o fenômeno de coalescência. Quanto maior o tempo de sonicação maior será a taxa de colisão e, por consequência, mais intensa será a coalescência, levando à quebra da emulsão.^{127,128}

Visto os pontos apresentados, conclui-se que a melhor condição para a formação das emulsões foi amplitude de 25% e tempo de sonicação de 10 s. Embora os ensaios tenham sido feitos em emulsões do tipo O/A com Triton X-100 (10% v/v), os mesmos resultados puderam ser alcançados para emulsões do tipo A/O com *n*-propanol. Ainda que o volume de líquido dos ensaios tenha sido de 0,5 mL, verificou-se que emulsões estáveis e homogêneas também puderam ser formadas quando utilizados volumes de 1 mL. Esses resultados demonstram a robustez do método de preparo de emulsões mediante a aplicação de ultrassom do tipo sonda, nas condições relatadas.

Para avaliar a possibilidade de aumento da massa de bio-óleo nas emulsões, foram preparadas emulsões com volume final de 0,5 mL nas condições otimizadas através dos diagramas de fases ternários (40% O/A e 44% A/O). A partir disso, foram feitas adições sucessivas de 50 mg de bio-óleo (10% da massa total), onde, a cada adição, foram feitos ciclos de US por 10 s com amplitude de 25%. Para a emulsão 40% O/A (com Triton X-100 (10% v/v)) não foi possível aumentar a massa de amostra, uma vez que a adição de 50 mg de bio-óleo promoveu a aderência do óleo nas paredes do frasco, bem como o início do processo de separação de fases.

Por outro lado, para a emulsão 44% A/O (com *n*-propanol) foi possível realizar aumentos sucessivos de 50, 100, 150 e 200 mg de bio-óleo (Figura 8). Todavia, as emulsões com 100 (imagem B), 150 (imagem C) e 200 mg (imagem D) de bio-óleo permaneceram estáveis somente por 5, 2 e 1 min, respectivamente, sendo observada a aderência do óleo nas paredes do frasco, em B e C, e a completa separação das fases, em D. Já a emulsão preparada com adição de 50 mg de bio-óleo (imagem A) permaneceu estável e homogênea por, pelo menos, 1 dia.

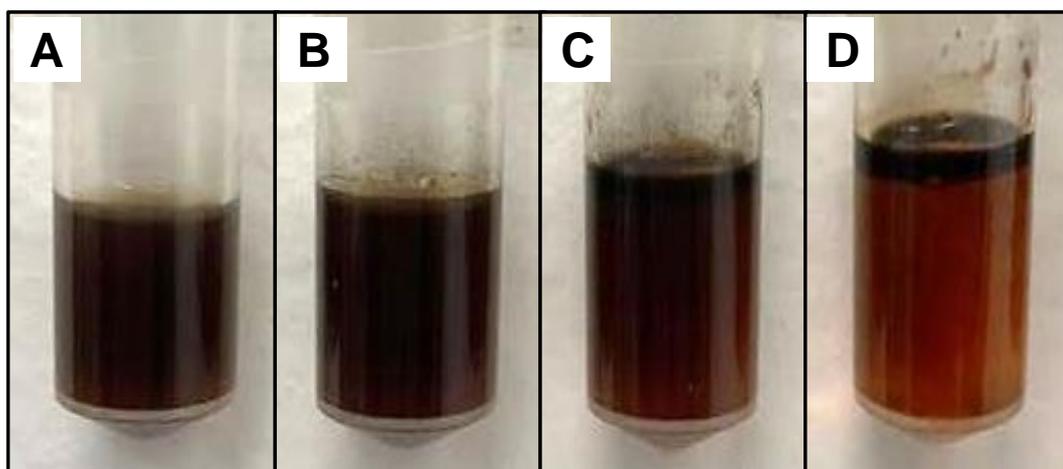


Figura 8. Avaliação da estabilidade de emulsões preparadas a partir de *n*-propanol e US com adição de (A) 50, (B) 100, (C) 150 e (D) 200 mg de bio-óleo.

A aplicação do US do tipo sonda permitiu aumentar a concentração de bio-óleo nas emulsões preparadas com *n*-propanol de 56 para 60%. Esse resultado é bastante vantajoso no que diz respeito à determinação de analitos em baixa concentração. No entanto, deve-se avaliar criteriosamente a necessidade do seu uso, uma vez que estão atreladas questões como custo e possibilidade de contaminação cruzada, devido à limpeza da ponteira de US poder ser feita apenas com *iso*-propanol. Além

disso, a frequência analítica diminui, visto que se faz indispensável a limpeza da ponteira entre uma amostra e outra. Ainda, a possibilidade de contaminação por elementos formadores da sonda, como Ti, Cr e Al, limitam a sua utilização na determinação desses elementos em baixo nível de concentração.^{129,130}

5.2.3 Caracterização das emulsões por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A classificação das emulsões e as suas propriedades físico-químicas, tal como a estabilidade, são governadas pelo tamanho das gotas dispersas.^{95,98} Dentre as técnicas disponíveis para a determinação do diâmetro de partículas, a técnica DLS apresenta-se como uma alternativa viável para a caracterização de emulsões, uma vez que possibilita a determinação de partículas nanométricas com exatidão.^{131,132}

No DLS, um feixe de radiação LASER é incidido sobre a amostra e, ao interagir, parte da radiação é espalhada e tem sua intensidade medida em um ângulo fixo com relação ao feixe incidente. As flutuações de intensidade da luz ao decorrer do tempo fornecem informações acerca do movimento da partícula e pode-se, então, deduzir o coeficiente de difusão translacional, que indica a mobilidade de um soluto em um solvente. Essa mobilidade é inversamente proporcional ao tamanho da partícula e, portanto, é possível obter informações a respeito do seu raio hidrodinâmico.¹³³

No presente estudo foram caracterizadas emulsões, em duplicata, formadas a partir de Triton X-100 10% v/v (40% O/A) e *n*-propanol (44% A/O), e por agitação manual (AM) e ultrassom (US), totalizando oito ensaios. Os resultados estão apresentados na Figura 9.

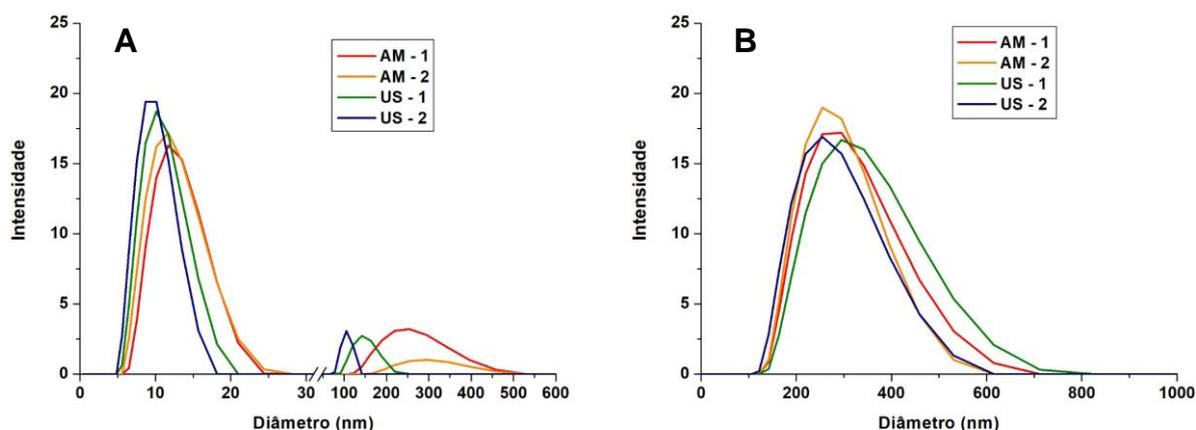


Figura 9. Distribuição do tamanho das gotas das emulsões formadas a partir de agitação manual (AM) e ultrassom (US) para (A) Triton X-100 (10% v/v) (40% O/A) e (B) *n*-propanol (44% A/O). As replicatas são indicadas por 1 e 2.

Com respeito aos ensaios realizados com Triton X-100, observa-se, na Figura 9, que tanto as emulsões formadas por AM quanto por US possuem dois grupos com distintos tamanhos de gota. Para o primeiro grupo, os diâmetros foram $12,4 \pm 0,7$ nm (AM) e $10,9 \pm 0,3$ nm (US), enquanto que para o segundo grupo os diâmetros foram 288 ± 46 nm (AM) e de 170 ± 5 nm (US). Embora não haja diferença estatística significativa (95% de confiança, teste *t-student*) entre os resultados, gotas com diâmetros ligeiramente inferiores foram formadas a partir do uso de US. Para a AM, 88 e 12% das gotas estavam no primeiro e segundo grupo, respectivamente. Já para o uso de US, a contribuição das gotas menores aumenta para 91%, enquanto a contribuição de maiores decai para 9%. Essa distribuição está de acordo com o esperado, uma vez que a energia fornecida ao sistema por meio de US é significativamente maior. Ainda, é possível notar que o uso de US contribui para a obtenção de gotas com tamanhos mais homogêneos. Isso pode ser constatado por meio dos perfis de distribuição de tamanho mais estreitos (Figura 9), bem como pelos desvios padrão dos diâmetros médios.

Para os ensaios feitos a partir de *n*-propanol foi observada a presença de apenas um grupo populacional, com gotas de diâmetros médios de 284 ± 13 nm (AM) e de 308 ± 20 nm (US), que não foram significativamente diferentes (95% de confiança, teste *t-student*) entre si.

A partir da análise da distribuição dos tamanhos das gotas e avaliando os demais parâmetros relacionados às emulsões, como estabilidade termodinâmica, alta concentração de emulsificante (>10%) e formação por titulação de fase (espontânea), podemos classificar as emulsões formadas com Triton X-100 (O/A) e *n*-propanol (A/O) como microemulsões, o que está de acordo com o esperado para o uso desses emulsificantes.^{99,102}

De modo geral, o uso de US não teve efeito significativo no preparo das microemulsões, tanto para a emulsão A/O quanto para a emulsão O/A. Por essa razão, a utilização de US foi descartada na realização do restante do trabalho devido ao maior custo, à possibilidade de contaminação e à diminuição da frequência analítica. Assim, a microemulsão com maior massa de amostra e preparada de forma manual a partir de *n*-propanol (44% A/O) foi escolhida para os estudos posteriores relacionados à determinação de Cr e Cu por GF AAS.

5.3 DETERMINAÇÃO DE Cr E Cu POR GF AAS

Com o objetivo de compreender o comportamento térmico dos analitos e garantir a melhor sensibilidade sem interferências de matriz, foi realizado o estudo do programa de aquecimento do tubo de grafite, em que se otimizou as temperaturas de secagem, pirólise e atomização. A temperatura de secagem foi escolhida de forma visual, de modo a garantir a completa evaporação do solvente sem projeções da amostra durante o aquecimento. Já as temperaturas de pirólise e atomização foram escolhidas, respectivamente, como a maior temperatura, a fim de eliminar a maior quantidade possível de matriz sem que se ocorresse perdas do analito por volatilização, e a menor temperatura que permitisse a completa atomização do analito, prevenindo a vida útil do atomizador. Para a etapa de secagem, além da temperatura, também foram ajustados os tempos de rampa e de permanência, mantendo-se constante o tempo total do programa de aquecimento.

5.3.1 Otimização dos programas de temperatura

Os programas de temperatura foram otimizados a partir de microemulsões preparadas em *n*-propanol, a saber, 44% A/O. Adicionalmente, foram construídas curvas de pirólise e atomização para uma solução padrão em meio aquoso, com e sem o uso de modificador químico (Pd). Para Cr, a temperatura de pirólise foi avaliada

entre 900 e 1600 °C, mantendo-se a temperatura de atomização fixa em 2300 °C. Após escolhida a temperatura de pirólise, essa foi mantida constante e, então, avaliou-se a temperatura de atomização entre 2000 e 2400 °C. As curvas de temperatura de pirólise e atomização estão apresentadas na Figura 10.

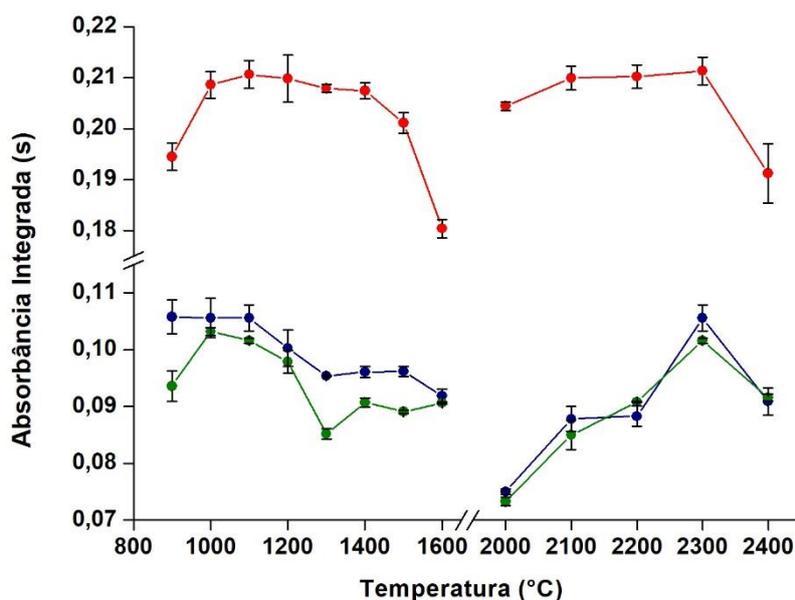


Figura 10. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Cr em microemulsão (—), em solução contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr (—) e em solução contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr na presença de $5 \mu\text{g}$ de Pd como modificador químico (—). As barras verticais indicam o desvio padrão ($n=3$).

Para Cr em solução, observa-se que o comportamento térmico, com e sem o uso de modificador químico, é semelhante, tanto para a etapa de pirólise quanto para a etapa de atomização, demonstrando sua estabilidade térmica. Por outro lado, na presença da amostra, seu comportamento térmico é alterado. Na etapa de pirólise, a absorbância do Cr permaneceu constante de 1000 a 1400 °C, evidenciando uma maior estabilidade térmica do analito nessas condições. Quando a temperatura foi aumentada para 1500 °C, houve redução do sinal analítico, indicativo da perda de analito por volatilização na etapa de pirólise. Essa evidência é comprovada quando, na temperatura de 1600 °C, houve uma diminuição significativa da absorbância, reduzindo em 13% o valor de absorbância integrada. Já quando a temperatura de pirólise foi menor que 1000 °C, a redução do sinal analítico pode estar relacionada

com a baixa eficiência de remoção da matriz, levando a interferências na etapa de atomização do analito. Essa hipótese é sustentada quando se observam os sinais de fundo (BG) para as diferentes temperaturas de pirólise avaliadas. É possível verificar na Figura 11 que a contribuição do BG é praticamente constante entre 1000 e 1300 °C, sofrendo uma leve redução em 1400 °C em decorrência da maior eficiência de remoção da matriz. Em contrapartida, quando a temperatura de pirólise é de 900 °C, nota-se que a contribuição do BG aumenta significativamente. Isto se deve ao alto conteúdo de matéria orgânica na matriz analisada, onde é verificada a liberação de vapores durante a etapa de pirólise, conforme já relatado por outros autores.^{134,135}

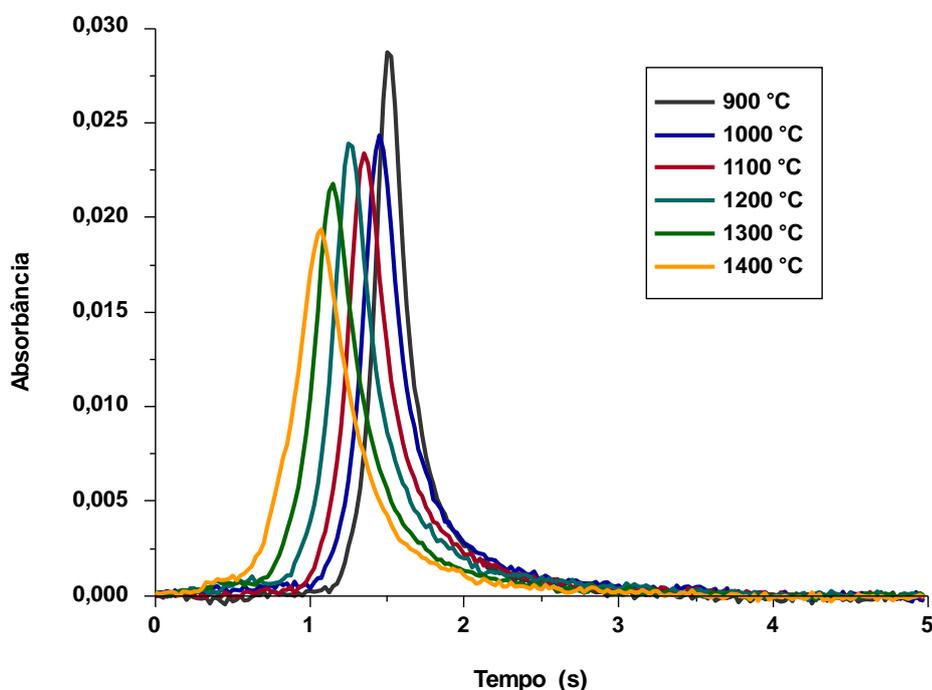


Figura 11. Perfis dos sinais de fundo (BG) na determinação de Cr em bio-óleo para temperaturas de pirólise entre 900 e 1400 °C. A temperatura de atomização foi 2300 °C.

Uma vez que as temperaturas de pirólise entre 1000 e 1400 °C, na presença da amostra, não apresentaram diferença significativa (teste ANOVA, 95% de confiança) na absorvância, a mesma foi fixada em 1400 °C para garantir maior eliminação da matriz e redução das interferências na etapa de atomização.

Com respeito à temperatura de atomização, verifica-se que a absorvância do Cr, na presença da amostra, é semelhante em 2100, 2200 e 2300 °C, não havendo

diferença estatística significativa (teste ANOVA, 95% de confiança) entre os valores de absorvância. Em temperatura maior que 2300 °C, há a redução do sinal analítico provocada pela dispersão da nuvem atômica dentro do atomizador que, conseqüentemente, diminui a concentração de átomos no estado vapor. Já em temperatura mais baixa, como em 2000 °C, a menor absorvância do Cr pode estar relacionada com a baixa eficiência de atomização, fazendo com que somente parte do analito seja atomizado e vaporizado para a absorção da radiação emitida pela fonte.

Após as otimizações, as temperaturas de pirólise e atomização foram mantidas em 1400 e 2100 °C, respectivamente, alcançando-se uma massa característica (m_0) de 10,5 μg . Os sinais de absorvância gerados para a solução padrão de Cr, em meio de *n*-propanol e água, e para a microemulsão apresentaram perfis gaussianos semelhantes, como pode ser verificado na Figura 12.

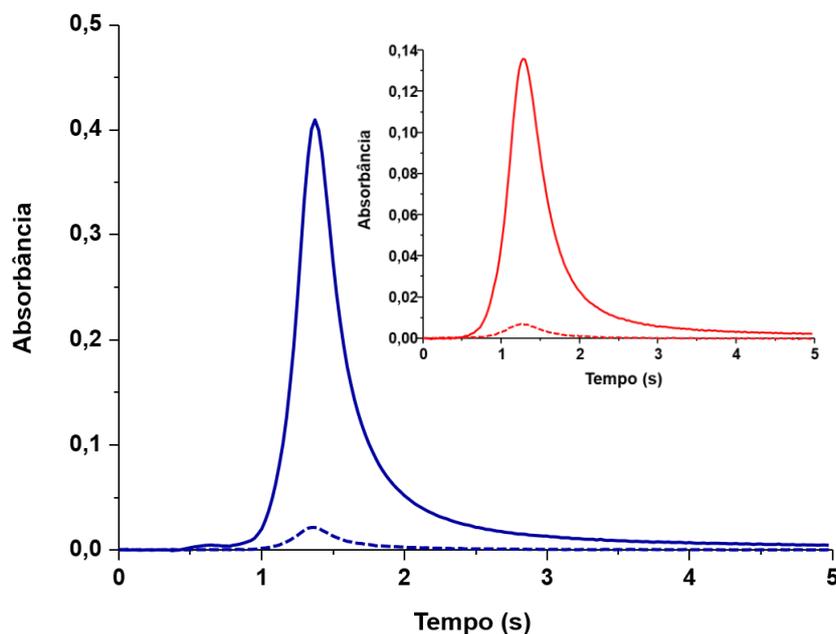


Figura 12. Perfis de absorvância AA (—) e BG (---) para microemulsão e AA (—) e BG (---) para solução, em meio *n*-propanol e água, contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr.

Uma vez que as soluções padrão foram preparadas no mesmo meio que as microemulsões, ou seja, na razão *n*-propanol/água=1,2, foram observadas interferências físicas durante a etapa de injeção das soluções dentro do atomizador.

Devido à diferença de viscosidade entre o *n*-propanol (2,256 mPa.s) e a água (1,002 mPa.s), foi notado que, ao dispensar a solução, parte dela permanecia dentro do capilar do pipetador automático, fazendo com que um volume menor que 20 µL fosse inserido dentro do atomizador. Ainda, em virtude da diferença de tensão superficial (*n*-propanol: 24 mN.m⁻¹ e água: 72 mN.m⁻¹), também pôde ser notado que a solução não era dispensada de maneira homogênea, como uma única gota esférica, mas sim em diversas microgotas que aderiam-se à parede externa do pipetador e eram carregadas para fora do atomizador. Por esse motivo, com o objetivo de atenuar as interferências observadas, foi ajustada a velocidade do pipetador automático (Figura 13), onde foram avaliadas as absorvâncias para uma solução contendo 10 µg L⁻¹ de Cr preparada em meio *n*-propanol/água=1,2 para velocidades de injeção de 40, 50, 65 e 75%.

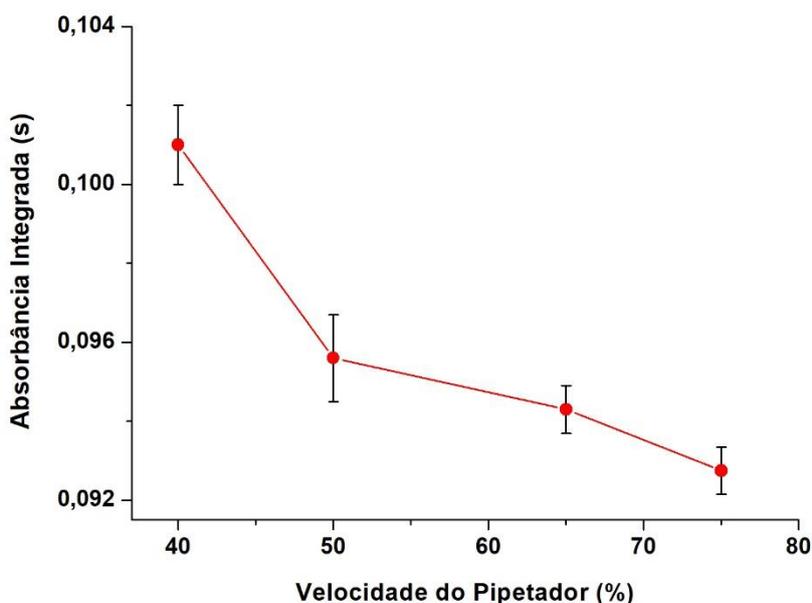


Figura 13. Influência da velocidade de injeção do pipetador automático na absorvância do Cr para uma solução contendo 10 µg L⁻¹ em meio *n*-propanol/água=1,2. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=3).

Como pode ser verificado na Figura 13, ao reduzir a velocidade de injeção de 75 para 40% há um aumento significativo da absorvância. Esse resultado está de acordo com o esperado, uma vez que, ao diminuir a velocidade na qual a solução é dispensada, garante-se que a transferência de massa do pipetador para o atomizador seja mais efetiva, conseguindo, desse modo, contornar a interferência física

observada. Velocidades menores que 40% não são permitidas pelo fabricante do equipamento e por essa razão não puderam ser avaliadas. Com esse ajuste, foi possível alcançar uma massa característica de 8,5 pg.

Cabe ressaltar que a m_0 alcançada é maior do que a recomendada pelo fabricante (7 pg) e as relatadas na literatura.^{64,136} Isso se deve ao fato de que as soluções padrão utilizadas no presente trabalho são preparadas em meio com *n*-propanol, cuja densidade difere em comparação com soluções puramente aquosas. Em razão da diferença de densidade, a massa de solução inserida no atomizador é menor e, por consequência, a sensibilidade diminui. Essa diferença é inerente à solução e não pode ser resolvida, fazendo com que seja necessária a calibração com ajuste de matriz. Para comparação, a m_0 alcançada para uma solução contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr puramente aquosa, preparada em meio de HNO_3 1% v/v, foi 5,7 pg, que está de acordo com a recomendação do fabricante e demais relatos da literatura.

Uma vez otimizadas a etapa de secagem e a velocidade do pipetador automático para Cr, tais condições foram mantidas constantes e procedeu-se com a otimização do programa de temperatura para Cu. Foram avaliadas as temperaturas de pirólise entre 600 e 1200 °C, mantendo-se a temperatura de atomização constante em 2000 °C. Após, manteve-se fixa a temperatura de pirólise e avaliou-se a temperatura de atomização entre 1700 e 2100 °C. As curvas de temperatura de pirólise e atomização estão apresentadas na Figura 14.

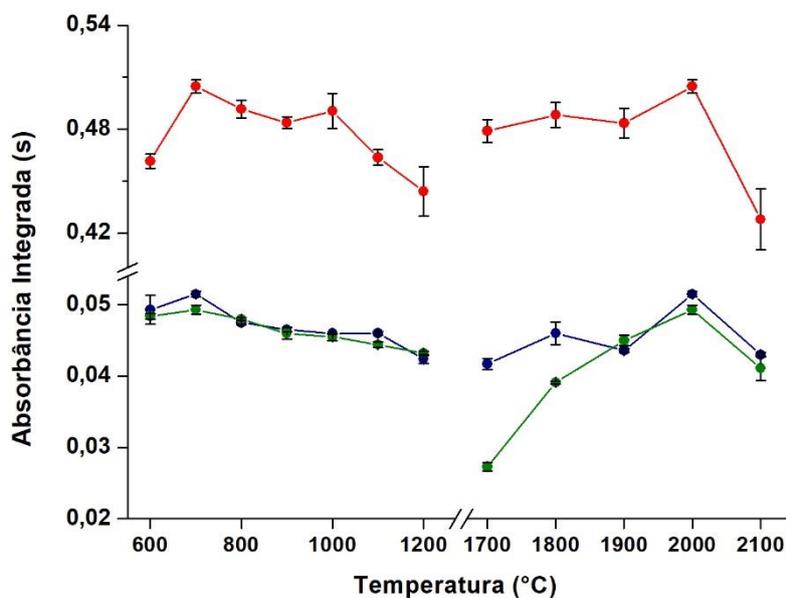


Figura 14. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Cu em microemulsão (-), em solução contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu (-) e em solução contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu na presença de $5 \mu\text{g}$ de Pd como modificador químico (-). As barras verticais indicam o desvio padrão ($n=3$).

Como pode ser notado na Figura 14, os perfis das curvas de pirólise e atomização foram semelhantes, tanto para Cu em solução, com e sem o uso de modificador químico, quanto na presença da amostra. Para a amostra, foi verificada uma maior tendência de queda da absorbância em temperaturas de pirólise acima de $700 \text{ }^\circ\text{C}$. Isto pode estar relacionado a três principais razões: *i*) mecanismo de atomização do analito; *ii*) espalhamento de radiação em baixas temperaturas, provocado pela liberação de fumaça durante a etapa de pirólise; *iii*) instabilidade térmica do analito, que induz a sua perda por volatilização em maiores temperaturas. Para avaliar cada uma das possibilidades, primeiramente foi verificada a existência de espalhamento de radiação pela liberação de vapores gerados a partir da matriz da amostra. Esse espalhamento usualmente ocorre em baixas temperaturas de pirólise quando a eliminação da matriz da amostra não é efetiva, interferindo na etapa de atomização. Para isso, foram estudados diferentes tempos de permanência na etapa de pirólise, a saber 20, 40 e 60 segundos. Não foi observada diferença significativa entre os três tempos avaliados, indicando que não havia interferências provocadas

por espalhamento de radiação. Por essa razão, foi mantido o tempo de pirólise em 20 s a fim de manter o tempo total da análise.

Posteriormente, foi estudada a estabilidade térmica do Cu na presença de 5 μg de Pd, tanto para a microemulsão quanto para uma solução contendo 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu (Figura 15). Essa avaliação foi feita para as temperaturas extremas (700 e 1200 $^{\circ}\text{C}$) e para uma temperatura intermediária (1000 $^{\circ}\text{C}$) da curva de pirólise.

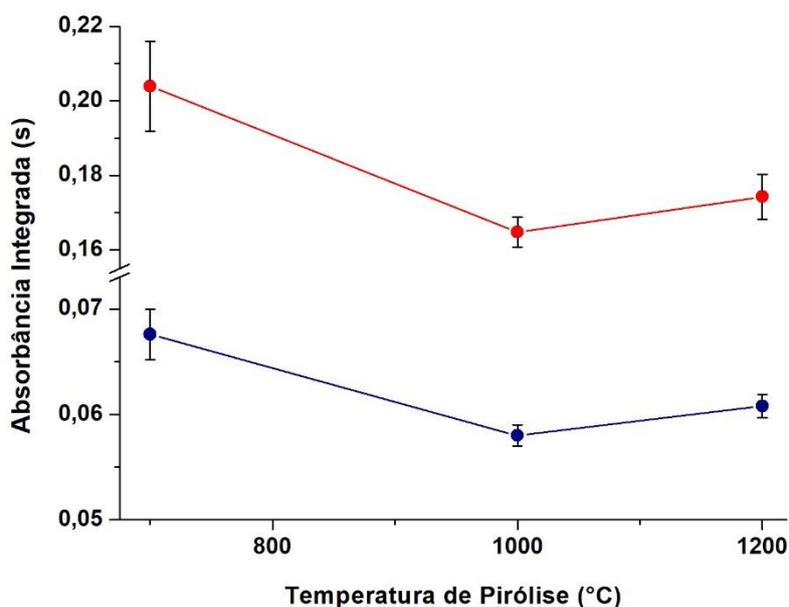


Figura 15. Avaliação da sensibilidade para a microemulsão (—) e para uma solução contendo 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu (—) na presença de 5 μg de Pd como modificador químico.

Na Figura 15, verifica-se que, embora a presença do modificador químico tenha proporcionado a equivalência de sensibilidade entre as temperaturas de 1000 e 1200 $^{\circ}\text{C}$, tanto para a microemulsão quanto para a solução padrão, a temperatura de pirólise em 700 $^{\circ}\text{C}$ ainda configura a condição de melhor sensibilidade para Cu (95% de confiança, teste *t-student*). Esse comportamento pode ser explicado, pois as principais espécies de Cu possivelmente presentes são CuO, Cu₂O e Cu₂. As espécies CuO e Cu₂O podem sofrer decomposição térmica e volatilização do Cu diretamente ao seu estado elementar ou podem gerar o dímero Cu₂ devido à alta taxa de colisão entre as moléculas. A molécula Cu_{2(g)}, por sua vez, se decompõe em Cu_(g) a 700 $^{\circ}\text{C}$, o que explica as perdas do analito em maiores temperaturas.^{137,138}

Por não ter sido observada mudança significativa no perfil do sinal analítico com ou sem o uso de modificador químico, optou-se pela não utilização do mesmo. Assim, concluiu-se que a maior sensibilidade do Cu em 700 °C está relacionada propriamente ao seu mecanismo de atomização e, portanto, manteve-se a temperatura de pirólise em 700 °C.

Com respeito à atomização do Cu, foi observado que a temperatura de 2000 °C representa a condição de maior absorvância. Quando há o aumento da temperatura para 2100 °C, o tempo de permanência dos átomos dentro do atomizador é reduzido, diminuindo a sensibilidade. Já quando a temperatura é inferior a 2000 °C, a atenuação de sensibilidade deve-se à menor presença de átomos no estado vapor.

Após as otimizações, foram mantidas as temperaturas de pirólise e atomização em 700 e 2000 °C, respectivamente, atingindo-se uma m_0 de 19,6 μg . Os perfis dos sinais de absorvância para a microemulsão e para a solução de Cu são apresentados na Figura 16.

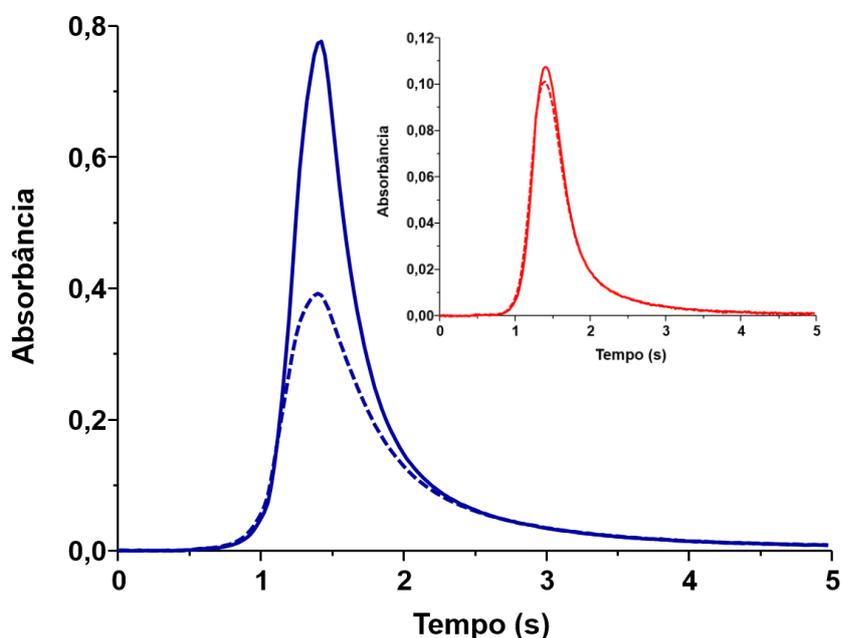


Figura 16. Perfis de absorvância AA (—) e BG (---) para microemulsão e AA (—) e BG (---) para solução, em meio *n*-propanol e água, contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu.

5.3.2 Avaliação de interferência provocada por efeito de matriz nas microemulsões

Visto que a análise de amostras com pouca ou nenhuma etapa prévia de preparo está sujeita a interferências decorrentes da presença da matriz da amostra, uma vez que essa é inserida de forma completa no atomizador, faz-se necessário verificar a existência ou não de efeito de matriz na determinação dos analitos.

Segundo a IUPAC, efeito de matriz é o efeito combinado de todos os componentes da amostra, que não o analito, na medida de quantificação.¹³⁹ O efeito de matriz é classificado como uma interferência química e a principal forma de reduzi-lo é através das condições STPF, tais como operação isotérmica, alta taxa de aquecimento na etapa de atomização e aquisição dos sinais em absorbância integrada.¹⁰⁹ Além disso, formas adicionais de contorná-lo são através da adição de modificadores químicos, da calibração por adição padrão e/ou da aplicação de fatores de diluição da amostra; contudo, desvantagens podem ser encontradas no que diz respeito à custo, frequência analítica e determinação de elementos em nível traço, respectivamente.¹⁴⁰

Para verificar a existência de efeito de matriz na determinação de Cr e Cu nas amostras de bio-óleo, foram preparadas duas curvas de calibração com concentrações entre 0 e 0,4 ng (0 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$). A curva de calibração por adição padrão foi preparada adicionando-se quantidades conhecidas de solução padrão às microemulsões das amostras; enquanto que a curva de calibração com solução padrão foi preparada a partir de adições da solução padrão ao branco das microemulsões, isto é, na ausência da amostra.

Como pode ser notado na Figura 17, as inclinações das curvas de calibração por adição padrão, 0,3829 e 0,4002, e de calibração com solução padrão, 0,3398 e 0,1550, diferem tanto para Cr quanto para Cu, respectivamente. Para Cr, houve um aumento aproximado de 13% na sensibilidade na presença da amostra, enquanto que para Cu esse aumento foi ainda mais expressivo, cerca de 160%. Esse resultado indica que a matriz das microemulsões formadas com bio-óleo tem efeito na determinação desses analitos e, portanto, curvas de calibração por adição padrão devem ser usadas para quantificá-los, ainda que as soluções de calibração sejam preparadas no mesmo ambiente químico das microemulsões.

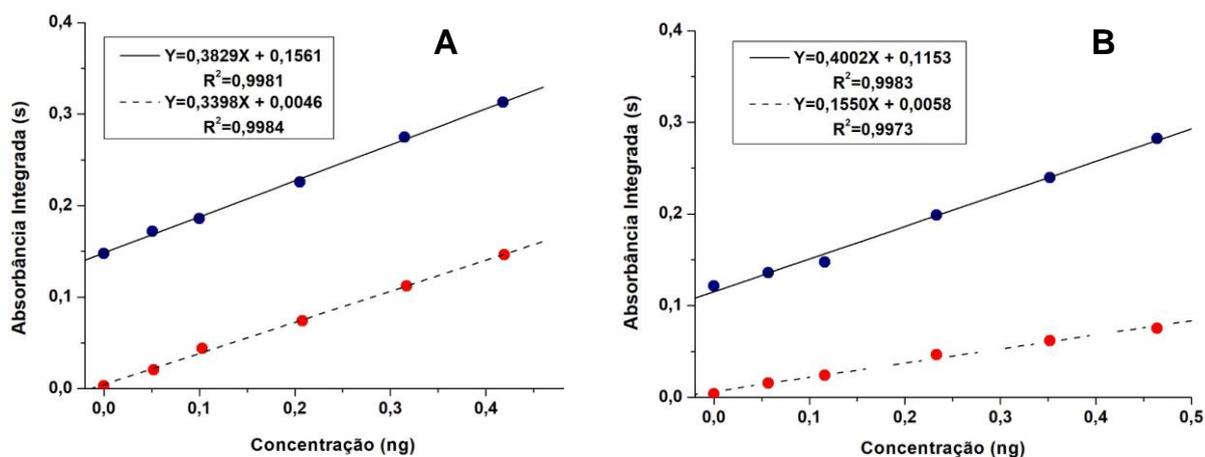


Figura 17. Efeito da matriz em microemulsões de bio-óleo na sensibilidade das curvas de calibração por adição padrão (●, —) e de calibração com solução padrão (●, - -) para (A) Cr e (B) Cu.

Com o objetivo de avaliar a exatidão dos resultados para as concentrações de Cr e Cu encontradas nas amostras preparadas na forma de microemulsão, com calibração por adição padrão, as concentrações foram comparadas às obtidas após a digestão da amostra e da microemulsão, com calibração com solução padrão. Para este estudo, foi escolhido o bio-óleo A4 em virtude da sua maior disponibilidade. A concentração de Cr obtida para a amostra preparada na forma de microemulsão, com calibração por adição padrão, foi $288 \pm 13 \text{ mg kg}^{-1}$, enquanto que as concentrações para a digestão da amostra e da microemulsão, com calibração com solução padrão, foram 302 ± 39 e $258 \pm 52 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. Para Cu, a concentração obtida para a amostra preparada na forma de microemulsão, com calibração por adição padrão, foi $184 \pm 30 \text{ mg kg}^{-1}$, enquanto que as concentrações para a digestão da amostra e da microemulsão, com calibração com solução padrão, foram 176 ± 26 e $119 \pm 21 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. Tanto para Cr quanto para Cu, os resultados não diferiram significativamente com 95% de confiança (teste *t-student*). Desse modo, inferiu-se que o aumento de sensibilidade na presença da matriz da amostra poderia ser provocado por algum composto presente exclusivamente na amostra sem etapa prévia de preparo e que, após a decomposição, tinha seu efeito anulado.

Uma hipótese é a presença de compostos orgânicos que podem agir como modificadores químicos, tais como os ácidos oxálico, ascórbico e cítrico. Segundo Volynskii,¹⁴¹ o mecanismo de ação do ácido oxálico é baseado em reações de troca

semelhantes às observadas para HNO_3 e NH_4NO_3 como modificadores. Nesse caso, o íon oxalato liga-se quimicamente ao analito, formando um composto mais estável e eliminando o possível interferente na etapa de pirólise. Já os ácidos ascórbico e cítrico podem agir de duas formas diferentes. A primeira é através das reações de troca, similares às do ácido oxálico, porém com menor eficiência. A segunda possibilidade é a redução de compostos metálicos a metais livres por mecanismos de dissociação térmica ($\text{MO} \rightarrow \text{M} + \text{O}$) e de redução ($\text{MO} + \text{C} \rightarrow \text{M} + \text{CO}$). A introdução desses ácidos no atomizador leva à redução da concentração de oxigênio livre na fase gasosa, aumentando a sensibilidade de elementos formadores de óxidos.

Outra possível causa para o aumento de sensibilidade é a influência dos solventes orgânicos, que podem alterar a superfície de contato entre a amostra e a superfície interna do atomizador, bem como possuem distintos potenciais de penetração no grafite, levando à formação de diferentes compostos com o analito. Dado que o bio-óleo é formado por muitos compostos orgânicos, esses podem agir em efeito combinado alterando a absorvância do analito.¹⁴²

Visto esses resultados, conclui-se que há a necessidade de realizar a quantificação de Cr e Cu em microemulsões de bio-óleo através da calibração por adição padrão. Embora tal calibração prejudique a frequência analítica devido ao maior tempo destinado à análise, o método de preparo da amostra proposto tem como vantagens a não utilização de ácidos inorgânicos e de equipamentos de alto consumo energético para digestão de amostra. Ademais, o método de decomposição também prejudica a frequência analítica, em decorrência da restrição do número de amostras que podem ser processadas por vez no equipamento. Além disso, o uso de emulsões possibilita a utilização de uma quantidade apreciável de amostra em baixo volume de solução, melhorando o LD e contribuindo para a quantificação de elementos em nível traço.

5.3.3 Estudo da estabilidade dos analitos nas microemulsões

Com a finalidade de verificar a estabilidade dos analitos nas microemulsões, foram preparadas curvas de calibração por adição padrão para Cr e Cu no intervalo de 0 a 0,4 ng (0 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$), as quais são apresentadas na Figura 18. A estabilidade dos analitos foi monitorada no dia do preparo das microemulsões e após permanecerem uma semana em repouso.

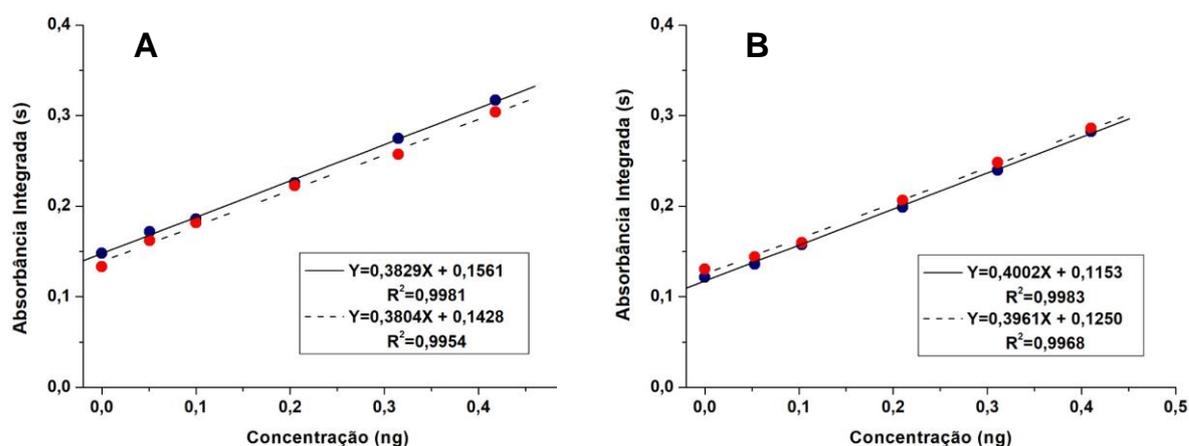


Figura 18. Avaliação da estabilidade de (A) Cr e (B) Cu em microemulsões de bio-óleo. As concentrações dos analitos foram monitoradas no dia do preparo das microemulsões (●, —) e após permanecerem uma semana em repouso (●, - -).

No intervalo de tempo avaliado, os analitos mantiveram-se estáveis nas microemulsões ao longo de toda a faixa de concentração, como pode ser comprovado através das inclinações das curvas de calibração da Figura 18, que não diferiram significativamente. Esses resultados indicam que o uso da microemulsão como método de preparo de amostra para posterior determinação de Cr e Cu por GF AAS é bastante vantajoso, uma vez que garante a estabilidade dos analitos em solução, impedindo sua deposição nas paredes do frasco e evitando suas perdas por volatilização ou precipitação junto da matriz da amostra. Resultados semelhantes foram previamente obtidos para Cr e Cu em emulsões de óleo bruto e nafta, respectivamente. Pessoa e colaboradores⁸¹ compararam a estabilidade do Cr em amostras de óleo bruto preparadas na forma de emulsão e diluídas em tolueno. Os autores observaram que, enquanto o sinal analítico se mantinha estável por um período mínimo de cinco dias para a emulsão, o mesmo só permanecia estável por um dia quando as amostras eram diluídas em solvente orgânico. Já Brum e colaboradores¹⁴³ monitoraram o sinal do Cu em emulsões de nafta por, aproximadamente, 4 horas e não observaram nenhuma variação significativa de sensibilidade durante esse período.

Em outro estudo, desenvolvido por Santos e colaboradores,¹⁴⁴ foi avaliada a estabilidade de Cr e Cu em emulsões de gasolina preparadas a partir de Triton X-100 ou brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Para Cu, o sinal analítico se manteve

constante em ambas as emulsões durante todo o período de tempo avaliado, 90 min. Por outro lado, para Cr, a intensidade do sinal só permaneceu constante durante 30 min quando o surfactante CTAB foi empregado, enquanto que para Triton X-100 foi verificada redução no sinal analítico em apenas 15 min.

5.3.4 Quantificação de Cr e Cu em bio-óleo por GF AAS

A quantificação de Cr e Cu nas amostras de bio-óleo preparadas na forma de microemulsão foi feita através da calibração por adição padrão, seguindo-se o método desenvolvido. Os resultados encontrados estão reportados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações de Cr e Cu encontradas nas amostras de bio-óleo preparadas na forma de microemulsão por GF AAS. Os resultados são a média e o desvio padrão para três determinações (n=3).

Amostra	Cr, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Cu, $\mu\text{g kg}^{-1}$
A1	4881 \pm 600	3668 \pm 502
A2	76,1 \pm 3,4	4,01 \pm 0,45
A3	155 \pm 37	58,0 \pm 14,2
A4	288 \pm 13	184 \pm 30

Como pode ser verificado na Tabela 4, foi possível quantificar Cr e Cu nas quatro amostras de bio-óleo analisadas no presente estudo, com concentrações variando de 76,1 a 4881 e de 4,01 a 3668 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O maior nível de contaminação observado, para ambos os analitos, foi na amostra A1. Essa maior concentração dos metais possivelmente está relacionada à própria biomassa (esterco bovino) utilizada na produção desse bio-óleo. A presença de metais nesse tipo de biomassa pode ser proveniente de alimentos, água e solo contaminados pelo uso excessivo de pesticidas e fertilizantes. Embora a amostra A1 tenha sofrido processo de extração líquido-líquido para isolamento da fração orgânica, é improvável que essa maior concentração dos analitos esteja relacionada a algum processo de “pré-concentração”. Jiang e colaboradores¹⁴⁵ estudaram a distribuição de Cr, Cu, Cd, Pb e As nos produtos obtidos a partir da liquefação hidrotérmica da planta *Amaranthus hypochondriacus* L. Os autores concluíram que mais de 90% do Cr, Cu, Cd e Pb presentes permaneceram retidos na fração sólida (bio-carvão), com concentrações

inferiores na fração aquosa e insignificantes na fração orgânica, denominada no presente trabalho como bio-óleo. Já para o As, cerca de 86% da concentração total ficou retida na fração aquosa, sendo o restante retido, preferencialmente, na fração sólida.

Apesar de os trabalhos publicados relatarem a presença de metais alcalinos e alcalinos terrosos em bio-óleo, são raros os que concedem atenção à presença de outros metais, declarando, muitas vezes, a ausência dos mesmos.^{4,31} Todavia, a determinação de metais é de extrema importância, não somente ao que refere à poluição ambiental, como também à degradação dos combustíveis provocada por processos oxidativos que são desencadeados e/ou intensificados na presença desses metais. Para Cu, por exemplo, Jain e colaboradores relatam que $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ do elemento é suficiente para afetar a estabilidade oxidativa do biodiesel, promovendo mudanças em suas propriedades físico-químicas.⁶³

O monitoramento e o controle de metais em combustíveis, de forma geral, não é exigido pela legislação brasileira, salvo Pb em gasolina, e Cu e Fe em etanol. Contudo, a resolução nº 842 da ANP, publicada em 2021, estabelece normas de especificação para o diesel verde, exigindo o monitoramento de 22 elementos químicos, entre eles Cr e Cu, e estabelecendo um teor máximo de 1 mg kg^{-1} .⁶⁹

Em relação às concentrações de Cr e Cu encontradas nas amostras analisadas neste trabalho, as amostras A2, A3 e A4 estariam em conformidade com a resolução nº 842, com concentrações menores que 1 mg kg^{-1} . Já a amostra A1 estaria em desconformidade, contendo teores aproximados de 5 e 4 vezes acima do máximo permitido para Cr e Cu, respectivamente.

Até o momento, foi encontrado somente um trabalho que estuda a presença de Cr e Cu em bio-óleo. Em sua dissertação de mestrado, Evangelista⁶⁸ estudou os métodos de decomposição em forno micro-ondas, em bloco digestor e por via seca para a posterior determinação de Fe, Cu, Cr, Zn e Ni por F AAS em bio-óleo produzido a partir de óleo de soja. Foram encontradas concentrações médias de 0,15 e $2,98 \text{ mg kg}^{-1}$ para Cr e Cu, respectivamente, considerando os diferentes métodos de preparo da amostra. As concentrações de Cr e Cu encontradas por Evangelista foram similares às obtidas nas amostras do presente trabalho; contudo, é inviável fazer uma análise aprofundada desses resultados, uma vez que apenas uma amostra de bio-óleo foi analisada por Evangelista.

Ademais, o nível das concentrações de Cr e Cu encontradas nas amostras de bio-óleo estudadas neste trabalho está condizente com o de outros autores que também avaliaram a presença desses contaminantes em combustíveis, tais como biodiesel, gasolina e óleo bruto. Barela e colaboradores⁷⁸ utilizaram a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas para posterior determinação de contaminantes inorgânicos em biodiesel por ICP-MS. Dentre as três amostras analisadas, duas apresentaram teor de Cr menor que o LD ($0,007 \mu\text{g g}^{-1}$), enquanto uma das amostras continha $1,25 \mu\text{g g}^{-1}$ do elemento. Para Cu, a concentração variou de $<0,014$ (LD) a $0,091 \mu\text{g g}^{-1}$. Em estudo desenvolvido por Cunha e colaboradores¹²¹ para a determinação de Cr e Cu em gasolina por GF AAS e utilizando um método automatizado para o preparo de microemulsões das amostras, as concentrações variaram, nas seis amostras analisadas, de $0,12$ a $0,53$ e de $0,50$ a $1,21 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cr e Cu, respectivamente. Na determinação de contaminantes inorgânicos em óleo bruto por GF AAS, Luz e colaboradores¹⁰⁵ investigaram a análise da amostra na forma de emulsão. A concentração de Cu nas seis amostras analisadas variou de $<0,03$ (LD) a $0,18 \mu\text{g g}^{-1}$, com concentração média de $0,09 \mu\text{g g}^{-1}$. Em outro estudo, também para a determinação de contaminantes inorgânicos em óleo bruto, Dittert e colaboradores⁶⁴ investigaram o uso da amostragem direta na determinação de Cr por HR-CS GF AAS. Dentre as cinco amostras analisadas, a concentração de Cr variou de $4,1$ a 173ng g^{-1} .

É importante ressaltar que são escassos os trabalhos analíticos destinados à caracterização inorgânica de bio-óleo e não se tem conhecimento de nenhum estudo que utilize o método de preparo de amostra por emulsão para a quantificação de metais nessas amostras.

5.3.5 Figuras de mérito

5.3.5.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados seguindo o critério de três (3σ) e dez vezes (10σ), respectivamente, o desvio padrão de dez medidas consecutivas do branco analítico somados à média dos brancos. Para o cálculo, foram considerados 560mg de massa de amostra em 1000mg de emulsão. O branco analítico foi preparado a partir de uma mistura *n*-propanol e água na razão $1,2$. O volume de injeção considerado foi de $20 \mu\text{L}$.

Uma vez que a quantificação dos analitos foi feita por meio da calibração por adição padrão, os valores de LD e LQ variaram de acordo com os coeficientes angulares das equações de regressão linear das curvas de calibração. Dessa forma, para as amostras A1 e A3, o coeficiente angular médio foi de 0,3437 para Cr e de 0,1546 para Cu, e para as amostras A2 e A4, o coeficiente angular médio foi de 0,4339 para Cr e de 0,2415 para Cu.

Os parâmetros de mérito, como LD, LQ, equação de regressão linear e coeficiente de determinação estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros de mérito do método proposto para a determinação de Cr e Cu em bio-óleo por GF AAS após preparo das amostras por microemulsão e calibração por adição padrão.

Parâmetro de mérito		Cr	Cu
LD, $\mu\text{g kg}^{-1}$	A1 e A3	2,07	1,86
	A2 e A4	1,64	1,19
LQ, $\mu\text{g kg}^{-1}$	A1 e A3	4,58	3,82
	A2 e A4	3,63	2,45
Equação de regressão linear ^a			
A1		$y = 0,3561.m_{Cr^*} + 0,0182$	$y = 0,1329.m_{Cu^*} + 0,0158$
A2		$y = 0,4437.m_{Cr^*} + 0,0810$	$y = 0,2634.m_{Cu^*} + 0,0094$
A3		$y = 0,3313.m_{Cr^*} + 0,0596$	$y = 0,1763.m_{Cu^*} + 0,0088$
A4		$y = 0,4241.m_{Cr^*} + 0,0430$	$y = 0,2196.m_{Cu^*} + 0,0104$
Coeficiente de determinação, R^2			
A1		0,9986	0,9926
A2		0,9985	0,9937
A3		0,9935	0,9966
A4		0,9984	0,9959

^a Considerando fatores de diluição entre 1 e 20 vezes

* Massa em ng

Comparando os resultados alcançados no presente estudo com os relatados por Evangelista⁶⁸ para a determinação de metais em bio-óleo por F AAS, os LQs do método proposto são de até 500 e 700 vezes inferiores aos reportados para Cr (1,80 mg kg^{-1}) e Cu (1,83 mg kg^{-1}), respectivamente, após o preparo da amostra

por digestão ácida em forno micro-ondas. O ganho de sensibilidade é ainda maior em comparação ao preparo da amostra em bloco digestor (Cr: 3,23 mg kg⁻¹; Cu: 3,70 mg kg⁻¹) e por via seca (Cr: 3,45 mg kg⁻¹; Cu: 2,88 mg kg⁻¹), obtendo-se LQs até 1500 vezes inferiores.

Em estudo realizado por Luz e colaboradores,¹⁰⁵ utilizando a GF AAS para a determinação de metais em gasolina, diesel e óleo bruto preparadas como emulsão, o LD alcançado para Cu foi 0,03 µg g⁻¹, cerca de 16 e 25 vezes superior aos alcançados para as amostras A1/A3 e A2/A4, respectivamente, nesse trabalho. Enquanto no estudo conduzido por Luz e colaboradores foram utilizados 400 mg de amostra em um volume final de 25 mL de emulsão, no presente estudo uma emulsão estável pôde ser formada a partir de 560 mg de amostra em uma massa final de 1000 mg de emulsão, o que contribui fortemente para a diminuição dos LDs e LQs, tornando possível a quantificação de elementos em mais baixo nível de concentração.

Em outro estudo, em que emulsões de derivados de petróleo foram preparadas para a determinação de metais, os autores reportaram LDs de 0,01 e 0,02 µg g⁻¹ para Cr e Cu, respectivamente. Esses valores são de até 6 e 17 vezes mais altos aos encontrados no presente estudo. Altos valores de LD também foram observados para outros métodos de preparo da amostra, como a extração ácida assistida por ultrassom e a extração induzida por quebra de emulsão.¹⁴⁶ Para Cr, LDs e LQs da mesma magnitude foram relatados para a análise direta de óleos vegetais e matrizes de origem fóssil por HR-CS GF AAS.^{64,147}

O método proposto neste trabalho possibilitou a obtenção de resultados satisfatórios, inclusive quando comparados a técnicas analíticas mais sensíveis, como a ICP-MS. Em estudo realizado por Dutra¹¹⁴ para a determinação de metais em biodiesel por ICP-MS após preparo da amostra por MW-AD, LQs de 685,9 e 125,0 ng g⁻¹ foram obtidos para Cr e Cu, respectivamente. Em um segundo estudo, realizado por Barela,¹⁴⁸ utilizando a digestão ácida assistida por radiação ultra-violeta (MW-UV) e a ICP-MS para monitoramento da qualidade do biodiesel, foram alcançados LQs de 0,40 e 7,20 ng g⁻¹ para Cr e Cu, respectivamente.

Desse modo, o método proposto para o preparo da amostra por emulsão apresenta-se como uma alternativa simples e de mais baixo custo para a caracterização inorgânica de bio-óleo por GF AAS, possibilitando a quantificação de elementos em baixo nível de concentração. Ademais, o preparo da amostra por

emulsão, quando comparado a MW-AD e MW-UV, viabiliza uma maior frequência analítica. Desse modo, a emulsão permite o preparo de, no mínimo, 20 amostras por hora; enquanto que a MW-AD e a MW-UV permitem, no máximo, o preparo de 8 amostras por hora, a depender da configuração instrumental.

5.3.5.2 Avaliação da exatidão

A exatidão do método proposto foi verificada através de CRM e mediante o preparo de amostra por MW-AD. A MW-AD foi escolhida como técnica comparativa por ser amplamente empregada para a decomposição de materiais com alto conteúdo de matéria orgânica, permitindo a quantificação de metais sem interferência da matriz. Os resultados obtidos na avaliação da exatidão para Cr e Cu nas amostras são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados obtidos para Cr e Cu em amostras de bio-óleo após preparo por microemulsão e por MW-AD. Os resultados são a média e o desvio padrão para três determinações (n=3).

Amostra	Cr, $\mu\text{g kg}^{-1}$		Cu, $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	Microemulsão	MW-AD	Microemulsão	MW-AD
A1	4881 \pm 600	5928 \pm 22	3668 \pm 502	3944 \pm 6
A2	76,1 \pm 3,4	78,1 \pm 11,2	4,01 \pm 0,45	<18,8
A3	155 \pm 37	150 \pm 3	58,0 \pm 14,2	<18,8
A4	288 \pm 13	302 \pm 39	184 \pm 30	176 \pm 26
LD	2,07 ^a /1,64 ^b	15,9	1,86 ^a /1,19 ^b	11,8
LQ	4,58 ^a /3,63 ^b	32,4	3,82 ^a /2,45 ^b	18,8

^a A1 e A3 ^b A2 e A4

As concentrações de Cr e Cu encontradas após o preparo das amostras por microemulsão e a calibração por adição padrão não foram estatisticamente diferentes (95% de confiança, teste *t-student*) às encontradas após a MW-AD e a calibração com solução padrão. Embora o método proposto tenha como desvantagem a quantificação dos analitos pela calibração por adição padrão, contribuindo para o aumento do tempo de análise, o tempo total requerido é menor, em virtude do elevado tempo consumido nos métodos de decomposição de amostra. Enquanto uma emulsão pode ser formada

em um tempo de 30 segundos sob agitação manual, o tempo requerido na digestão ácida da amostra é da ordem de 1 hora. Ademais, o preparo da amostra por emulsão não necessita de equipamentos específicos e de ácidos concentrados, que encarecem e dificultam a análise, além de aumentar a probabilidade de contaminação. Outro ponto positivo é que as emulsões podem ser formadas em escala menor, cerca de 1 mL, que é um volume suficiente para a análise por GF AAS. Já os métodos que envolvem a digestão da amostra implicam em um volume mínimo de 25 mL de solução final para a transferência quantitativa da amostra, contribuindo para a geração de resíduos. Esse maior volume de solução, aliado, na maioria das vezes, a etapas de diluição para correção da acidez final, acarreta em prejuízos aos LDs e LQs. Como pode ser observado na Tabela 6, os LDs e LQs para a MW-AD são de até 10 e 9 vezes superiores, respectivamente, aos obtidos para Cr e Cu na microemulsão. Seguindo a estrita recomendação do fabricante para evitar desgastes excessivos do atomizador, foi mantida uma concentração ácida máxima de 1% v/v, o que tornou inevitável a diluição das amostras em, no mínimo, quatro vezes. Dessa forma, embora fosse possível quantificar ambos os analitos após o preparo das amostras por MW-AD, a quantificação de Cu no bio-óleo A3 foi prejudicada.

Ainda para avaliar a exatidão do método proposto, foi analisado o CRM HU-1 *used oil*, de matriz similar a das amostras de bio-óleo. Os resultados obtidos na análise do CRM são reportados na Tabela 7.

Tabela 7. Análise do CRM HU-1 (*used oil*) para avaliação da exatidão na determinação de Cr e Cu por GF AAS após preparo por microemulsão. Os resultados são a média e o desvio padrão para três determinações (n=3).

Analito	Valor Encontrado, $\mu\text{g g}^{-1}$	Valor Certificado, $\mu\text{g g}^{-1}$
Cr	11,5 ± 0,8	15 ± 2
Cu	3204 ± 48	3132 ± 226

Como pode ser verificado na Tabela 7, os valores das concentrações de Cr e Cu encontrados na análise do CRM não apresentaram diferença estatística significativa dos valores certificados, com 95% de confiança (teste *t-student*). Esse resultado evidencia a exatidão do método desenvolvido e indica que o preparo da

amostra por microemulsão e o emprego da GF AAS é uma proposta adequada para a determinação de Cr e Cu em amostras de bio-óleo.

6 CONCLUSÕES

A partir do desenvolvimento deste trabalho foi possível demonstrar a adequabilidade do método de preparo de amostra de bio-óleo por microemulsão para subsequente determinação de Cr e Cu por GF AAS. Como vantagens, podem ser apontadas a simplicidade, o rápido tempo de preparo e a ausência de ácidos ou reagentes concentrados.

Para além dos trabalhos dispostos na literatura que não investigam a formação e a caracterização das emulsões, neste estudo foram avaliados parâmetros importantes, tais como massa de amostra, tipos de emulsificantes, influência do ultrassom, estabilidade dos analitos e diâmetro das gotas dispersas. Com o auxílio dos diagramas de fases ternários, foram estudados dois emulsificantes com propriedades químicas distintas (Triton X-100 e *n*-propanol) e suas funções na obtenção de emulsões do tipo O/A ou A/O, visando aumentar a massa de amostra e, conseqüentemente, melhorar os LDs e LQs do método proposto. Com este estudo, foi possível formar emulsões do tipo O/A com até 560 mg de bio-óleo, empregando *n*-propanol como emulsificante, e do tipo A/O com até 400 mg de bio-óleo, empregando Triton X-100 como emulsificante. De acordo com o tamanho das gotas dispersas das emulsões, essas foram caracterizadas como microemulsões.

Foram constatadas interferências por efeito de matriz para ambos os analitos, onde verificou-se o aumento do sinal analítico em até 160% quando na presença da amostra. Por essa razão, a quantificação de Cr e Cu só pôde ser feita através da calibração por adição padrão.

Com o desenvolvimento deste trabalho, foi permitida a quantificação de Cr e Cu nas quatro amostras de bio-óleo analisadas, cujas concentrações variaram de 76,1 a 4881 e de 4,01 a 3668 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Quando comparados os resultados com o limite máximo permitido para Cr e Cu em diesel verde (1 mg kg^{-1}), uma das amostras apresentou desconformidade com a norma, atingindo concentrações até 5 vezes superiores para ambos os analitos.

Os LDs e LQs alcançados para Cr e Cu foram satisfatórios, cujos valores foram da mesma ordem de grandeza ou, em alguns casos, inferiores ao relatados para métodos de preparo de amostra mais eficientes, como a decomposição assistida por radiação micro-ondas, e para técnicas de determinação mais sensíveis, como a

ICP-MS. Ademais, os LDs e LQs atendem as exigências previstas na norma para o monitoramento de contaminantes inorgânicos em diesel verde.

A exatidão do método proposto foi comprovada pela análise de material de referência certificado (CRM HU-1 *used oil*) e pela comparação dos resultados obtidos por microemulsão e por MW-AD, os quais não diferiram estatisticamente com 95% de confiança. Esses resultados demonstram que o método proposto é adequado para a determinação de Cr e Cu em bio-óleo por GF AAS após preparo das amostras por microemulsão.

Cabe ressaltar que a representatividade de trabalhos voltados à caracterização inorgânica de bio-óleo é pequena, sendo somente explorada a caracterização orgânica dessas amostras. Contudo, avaliando os resultados alcançados neste estudo, demonstra-se a importância do monitoramento de contaminantes inorgânicos em bio-óleo, em vista de garantir a qualidade do biocombustível, a segurança ambiental e a integridade dos motores automotivos.

7 REFERÊNCIAS

1. Saravanan, A. P.; Pugazhendhi, A.; Mathimani, T. *Fuel* **2020**, 272, 117635.
2. Czernik, S.; Bridgwater, A. V. *Energy and Fuels* **2004**, 18 (2), 590–598.
3. Zhang, J.; Zhang, X. The Thermochemical Conversion of Biomass into Biofuels. In *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy: Construction, Biomedical, and other Industrial Applications*; Elsevier Ltd, 2019; p 532.
4. Kumar, R.; Strezov, V. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2021**, 135, 110152.
5. Beker, S. A.; Machado, M. E.; Maciel, G. P. S.; Silva, R.; Cataluña, R.; Caramão, E. B.; Bento, F. M. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, 27 (1), 91–98.
6. Chaiwat, W.; Gunawan, R.; Gholizadeh, M.; Li, X.; Lievens, C.; Hu, X.; Wang, Y.; Mourant, D.; Rossiter, A.; Bromly, J.; Li, C. Z. *Fuel* **2014**, 116, 642–649.
7. Jain, S.; Sharma, M. P. *Fuel* **2014**, 116, 14–18.
8. Lim, J.; Lim, C.; Yu, L. E. *J. Environ. Monit.* **2009**, 11 (9), 1614–1621.
9. Haseeb, A. S. M. A.; Fazal, M. A.; Jahirul, M. I.; Masjuki, H. H. *Fuel* **2011**, 90 (3), 922–931.
10. Chen, M. qiang; Wang, J.; Zhang, M. xu; Chen, M. gong; Zhu, X. feng; Min, F. fei; Tan, Z. cheng. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2008**, 82 (1), 145–150.
11. Lienemann, C. P.; Dreyfus, S.; Pecheyran, C.; Donard, O. F. X. *Oil Gas Sci. Technol.* **2007**, 62 (1), 69–77.
12. Rocha, M. S.; Mesko, M. F.; Silva, F. F.; Sena, R. C.; Quaresma, M. C. B.; Araújo, T. O.; Reis, L. A. *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, 26 (2), 456–461.
13. Korn, M. das G. A.; Santos, D. S. S. dos; Welz, B.; Vale, M. G. R.; Teixeira, A. P.; Lima, D. de C.; Ferreira, S. L. C. *Talanta* **2007**, 73 (1), 1–11.
14. Azevedo Silva, J. S.; Chaves, E. S.; Dos Santos, É. J.; Saint’Pierre, T. D.; Frescurab, V. L. A.; Curtius, A. J. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 21 (4), 620–626.
15. Potenza, R. F.; Quintana, G. O.; Cardoso, A. M.; Tsai, D. S.; Cremer, M. S.; Silva, F. B.; Carvalho, K.; Coluna, I.; Shimbo, J.; Silva, C.; Souza, E.; Zimbres, B.; Alencar, A.; Angelo, C.; Azevedo, T. *Análise Das Emissões Brasileiras de Gases de Efeito Estufa e Suas Implicações Para as Metas Climáticas Do Brasil 1970 – 2020*; 2021. https://seeg-br.s3.amazonaws.com/Documentos/Analiticos/SEEG_9/OC_03_relatorio_2021_FINAL.pdf.
16. Lee, K. T.; Ofori-boateng, C. *Sustainability of Biofuel Production from Oil Palm*

- Biomass*, 1st ed.; Springer, 2013.
17. Basu, P. Pyrolysis. In *Biomass Gasification, Pyrolysis and Torrefaction: Practical Design and Theory*; Elsevier Inc., 2013; p 530.
 18. Huber, G. W.; Iborra, S.; Corma, A. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (9), 4044–4098.
 19. Dhyani, V.; Bhaskar, T. *Renew. Energy* **2018**, *129*, 695–716.
 20. Roy, P.; Dias, G. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *77*, 59–69.
 21. Bridgwater, A. Fast Pyrolysis of Biomass for the Production of Liquids. In *Biomass Combustion Science, Technology and Engineering*; Woodhead Publishing, 2013; p 302.
 22. Isahak, W. N. R. W.; Hisham, M. W. M.; Yarmo, M. A.; Hin, T. Y. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, *16* (8), 5910–5923.
 23. Bridgwater, A. V.; Peacocke, G. V. C. *Renew. Sustain. energy Rev.* **2000**, *4* (1), 1–73.
 24. Pattiya, A. Fast Pyrolysis. In *Direct Thermochemical Liquefaction for Energy Applications*; Elsevier Ltd., 2018; p 356.
 25. Mohan, D.; Pittman, C. U.; Steele, P. H. *Energy and Fuels* **2006**, *20*, 848–889.
 26. Strezov, V.; Evans, T. J. *Biomass Processing Technologies*, 1st ed.; CRC Press, 2014.
 27. Xu, C.; Etcheverry, T. *Fuel* **2008**, *87* (3), 335–345.
 28. Akhtar, J.; Amin, N. A. S. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2011**, *15* (3), 1615–1624.
 29. Hu, Y.; Bassi, A.; Xu, C. C. Energy from Biomass. In *Future Energy: Improved, Sustainable and Clean Options for Our Planet*; Elsevier Ltd, 2020; p 792.
 30. Bridgwater, A. V. *Biomass and Bioenergy* **2012**, *38*, 68–94.
 31. Jr, C. U. P.; Mohan, D.; Eseyin, A.; Li, Q.; Ingram, L.; Hassan, E.-B. M.; Mitchell, B.; Guo, H.; Steele, P. H. *Energy and Fuels* **2012**, *26*, 3816–3825.
 32. Shahabuddin, M.; Kalam, M. A.; Masjuki, H. H.; Bhuiya, M. M. K.; Mofijur, M. *Energy* **2012**, *44* (1), 616–622.
 33. Echresh Zadeh, Z.; Abdulkhani, A.; Saha, B. *Energy* **2021**, *214*, 118930.
 34. Park, J. Y.; Kim, J. K.; Oh, C. H.; Park, J. W.; Kwon, E. E. *J. Environ. Manage.* **2019**, *234*, 138–144.
 35. Çulcuoğlu, E.; Ünay, E.; Karaosmanoğlu, F.; Angin, D.; Şensöz, S. *Energy Sources* **2005**, *27* (13), 1217–1223.

36. Bharath, G.; Hai, A.; Rambabu, K.; Banat, F.; Jayaraman, R.; Taher, H.; Bastidas-Oyanedel, J. R.; Ashraf, M. T.; Schmidt, J. E. *Biomass and Bioenergy* **2020**, *135*, 105523.
37. Channiwala, S. A.; Parikh, P. P. *Fuel* **2002**, *81* (8), 1051–1063.
38. Wang, H.; Lee, S. J.; Olarte, M. V.; Zacher, A. H. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4* (10), 5533–5545.
39. Karnjanakom, S.; Bayu, A.; Hao, X.; Kongparakul, S.; Samart, C.; Abudula, A.; Guan, G. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2016**, *421*, 235–244.
40. Oh, S.; Lee, J. H.; Choi, J. W. *Renew. Energy* **2020**, *160*, 1160–1167.
41. Pattiya, A. Catalytic Pyrolysis. In *Direct Thermochemical Liquefaction for Energy Applications*; Elsevier Ltd., 2018; p 356.
42. Yildiz, G.; Lathouwers, T.; Toraman, H. E.; Van Geem, K. M.; Marin, G. B.; Ronsse, F.; Van Duren, R.; Kersten, S. R. A.; Prins, W. *Energy and Fuels* **2014**, *28* (7), 4560–4572.
43. Zhou, C. H.; Xia, X.; Lin, C. X.; Tong, D. S.; Beltramini, J. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (11), 5588–5617.
44. Ateş, F.; Işıkdağ, M. A. *Fuel* **2009**, *88* (10), 1991–1997.
45. Liu, R.; Sarker, M.; Rahman, M. M.; Li, C.; Chai, M.; Nishu; Cotillon, R.; Scott, N. R. *Prog. Energy Combust. Sci.* **2020**, *80*, 100852.
46. Pan, P.; Hu, C.; Yang, W.; Li, Y.; Dong, L.; Zhu, L.; Tong, D.; Qing, R.; Fan, Y. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (12), 4593–4599.
47. Xie, Q.; Peng, P.; Liu, S.; Min, M.; Cheng, Y.; Wan, Y.; Li, Y.; Lin, X.; Liu, Y.; Chen, P.; Ruan, R. *Bioresour. Technol.* **2014**, *172*, 162–168.
48. Chaihad, N.; Situmorang, Y. A.; Anniwaer, A.; Kurnia, I.; Karnjanakom, S.; Kasai, Y.; Abudula, A.; Reubroycharoen, P.; Guan, G. *Renew. Energy* **2021**, *169*, 283–292.
49. Rahman, M. M.; Nishu; Sarker, M.; Chai, M.; Li, C.; Liu, R.; Cai, J. *J. Energy Inst.* **2020**, *93* (4), 1737–1746.
50. Yuan, X.; Ding, X.; Leng, L.; Li, H.; Shao, J.; Qian, Y.; Huang, H.; Chen, X.; Zeng, G. *Energy* **2018**, *154*, 110–118.
51. Prakash, R.; Singh, R. K.; Murugan, S. *J. Energy Inst.* **2015**, *88* (1), 64–75.
52. Guedes, C. L. B.; Adao, D. C.; Quessada, T. P.; Galao, D. B. E. O. F.; Di Mauro, E.; Perez, J. M. M.; Rocha, J. D. *Quim. Nova* **2010**, *33* (4), 781–786.

53. Hossain, M. M.; Scott, I. M.; McGarvey, B. D.; Conn, K.; Ferrante, L.; Berruti, F.; Briens, C. *J. Pest Sci. (2004)*. **2015**, 88 (1), 171–179.
54. Saidur, R.; Abdelaziz, E. A.; Demirbas, A.; Hossain, M. S.; Mekhilef, S. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2011**, 15 (5), 2262–2289.
55. Namkung, H.; Lee, Y. J.; Park, J. H.; Song, G. S.; Choi, J. W.; Kim, J. G.; Park, S. J.; Park, J. C.; Kim, H. T.; Choi, Y. C. *Energy* **2019**, 187, 115950.
56. Shen, Y.; Yu, S.; Yuan, R.; Wang, P. *Sci. Total Environ.* **2020**, 743, 140760.
57. Santos, L. N.; Neto, J. A. G.; Caldas, N. M. *Fuel* **2012**, 99, 9–12.
58. ANP Agência Nac. do Petróleo, Gás Nat. e Biocombustíveis **2014**.
59. ANP Agência Nac. do Petróleo, Gás Nat. e Biocombustíveis **2015**.
60. Saint’Pierre, T.; Aucélio, R. Q.; Curtius, A. J. *Microchem. J.* **2003**, 75 (1), 59–67.
61. Quadros, D. P. C.; Rau, M.; Idrees, M.; Chaves, E. S.; Curtius, A. J.; Borges, D. L. G. *Spectrochim. Acta - Part B* **2011**, 66 (5), 373–377.
62. Fazal, M. A.; Haseeb, A. S. M. A.; Masjuki, H. H. *Fuel Process. Technol.* **2010**, 91 (10), 1308–1315.
63. Jain, S.; Sharma, M. P. *Fuel* **2011**, 90 (5), 2045–2050.
64. Dittert, I. M.; Silva, J. S. A.; Araujo, R. G. O.; Curtius, A. J.; Welz, B.; Becker-Ross, H. *Spectrochim. Acta - Part B* **2009**, 64 (6), 537–543.
65. Lepri, F. G.; Chaves, E. S.; Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S.; Curtius, A. J.; De Oliveira, L. C. C.; De Campos, R. C. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2011**, 46 (3), 175–206.
66. Nakadi, F. V.; Prodanov, C.; Boschetti, W.; Vale, M. G. R.; Welz, B.; de Andrade, J. B. *Talanta* **2018**, 179, 828–835.
67. Duarte, Á. T.; Borges, A. R.; Zmozinski, A. V.; Dessuy, M. B.; Welz, B.; De Andrade, J. B.; Vale, M. G. R. *Talanta* **2016**, 146, 166–174.
68. Evangelista, S. M. Digestão Assistida Por Irradiação UV Como Um Método de Preparação Alternativo Para a Determinação de Metais Em Biodiesel e Bio-Óleo Por Espectrometria de Absorção Atômica Com Chama, Universidade de Brasília - UnB, 2011.
69. ANP Agência Nac. do Petróleo, Gás Nat. e Biocombustíveis **2021**.
70. Hassan, H.; Lim, J. K.; Hameed, B. H. *Bioresour. Technol.* **2016**, 221, 645–655.

71. Gazulla, M. F.; Rodrigo, M.; Orduña, M.; Ventura, M. J.; Andreu, C. *Talanta* **2017**, *164*, 563–569.
72. Sánchez, R.; Sánchez, C.; Lienemann, C. P.; Todolí, J. L. *J. Anal. At. Spectrom.* **2015**, *30* (1), 64–101.
73. Krug, F. J.; Rocha, F. R. P. *Métodos de Preparo de Amostras Para Análise Elementar*, 2nd ed.; EditSBQ, 2019.
74. Mitra, S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*; WILEY-INTERSCIENCE, 2003.
75. Knapp, G. *Mikrochim. Acta* **1991**, *104*, 445–455.
76. Chaves, E. S.; De Loos-Vollebregt, M. T. C.; Curtius, A. J.; Vanhaecke, F. *Spectrochim. Acta - Part B* **2011**, *66*, 733–739.
77. Williams, C. B.; Wittmann, T. G.; McSweeney, T.; Elliott, P.; Jones, B. T.; Donati, G. L. *Microchem. J.* **2017**, *132*, 15–19.
78. Barela, P. S.; Silva, N. A.; Pereira, J. S. F.; Marques, J. C.; Rodrigues, L. F.; Moraes, D. P. *Fuel* **2017**, *204*, 85–90.
79. Amais, R. S.; Garcia, E. E.; Monteiro, M. R.; Nogueira, A. R. A.; Nóbrega, J. A. *Microchem. J.* **2010**, *96* (1), 146–150.
80. Pereira, V. dos S. Desenvolvimento de Métodos Analíticos Para a Decomposição de Biodiesel e Cereais Por Combustão Iniciada Por Micro-Ondas (MIC) e Subsequente Determinação de Íons Fluoreto, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2020.
81. Pessoa, H. M.; Lyra, F. H.; De Castro, E. V. R.; De Campos, R. C.; Carneiro, M. T. W. D.; Brandão, G. P. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23* (8), 1421–1428.
82. Maessen, F. J. M. J.; Seeverens, P. J. H.; Kreuning, G. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **1984**, *39* (9–11), 1171–1180.
83. Todolí, J. L.; Mermet, J. M. *Encycl. Anal. Chem.* **2011**, 1–29.
84. 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. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21* (12), 2278–2284.
85. Binks, B. P. *Modern Aspects of Emulsion Science*, 1st ed.; The Royal Society of Chemistry, 1998.
86. Tadros, T. F. *Emulsion Science and Technology*, 1st ed.; WILEY-VCH, 2009.
87. Walstra, P. *Chem. Eng. Sci.* **1993**, *48* (2), 333–349.

88. Burguera, J. L.; Burguera, M. *Talanta* **2012**, *96*, 11–20.
89. Sartomo, A.; Santoso, B.; Ubaidillah; Muraza, O. *Energy Convers. Manag.* **2020**, *213*, 112817.
90. Kale, S.; Deore, S. *Syst. Rev. Pharm.* **2017**, *8* (1), 39–47.
91. Abbas, S.; Hayat, K.; Karangwa, E.; Bashari, M.; Zhang, X. *Food Eng. Rev.* **2013**, *5* (3), 139–157.
92. Abdulredha, M. M.; Siti Aslina, H.; Luqman, C. A. *Arab. J. Chem.* **2020**, *13* (1), 3403–3428.
93. Franzol, A.; Rezende, M. C. *Polimeros* **2015**, *25*, 1–9.
94. Viana, C.; Bohrer, D.; de Carvalho, L. M.; do Nascimento, P. C.; da Rosa, M. B. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2014**, *53*, 49–59.
95. Thakore, S.; Patel, R.; Patel, M. *Pharma Rev.* **2014**, 136–142.
96. Slomkowski, S.; Alemán, J. V.; Gilbert, R. G.; Hess, M.; Horie, K.; Jones, R. G.; Kubisa, P.; Meisel, I.; Mormann, W.; Penczek, S.; Stepto, R. F. T. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83* (12), 2229–2259.
97. Gupta, A.; Eral, H. B.; Hatton, T. A.; Doyle, P. S. *Soft Matter* **2016**, *12*, 2826–2841.
98. McClements, D. J. *Soft Matter* **2012**, *8* (6), 1719–1729.
99. Mariyate, J.; Bera, A. *J. Mol. Liq.* **2022**, *353*, 118791.
100. Souto, E. B.; Cano, A.; Martins-Gomes, C.; Coutinho, T. E.; Zielińska, A.; Silva, A. M. *Bioengineering* **2022**, *9* (158), 1–22.
101. Mason, T. G.; Wilking, J. N.; Meleson, K.; Chang, C. B.; Graves, S. M. *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18* (41), 635–666.
102. Kai Seng, K.; Voon Loong, W. Introductory Chapter: From Microemulsions to Nanoemulsions. In *Nanoemulsions - Properties, Fabrications and Applications*; IntechOpen, 2019; p 136.
103. Raposo, J. D.; Costa, L. M.; Barbeira, P. J. S. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26* (1), 147–155.
104. Amais, R. S.; Garcia, E. E.; Monteiro, M. R.; Nóbrega, J. A. *Fuel* **2012**, *93*, 167–171.
105. Luz, M. S.; Nascimento, A. N.; Oliveira, P. V. *Talanta* **2013**, *115*, 409–413.
106. Brandão, G. P.; de Campos, R. C.; de Castro, E. V. R.; de Jesus, H. C. *Spectrochim. Acta - Part B* **2008**, *63* (8), 880–884.

107. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed.; Thomson Brooks Cole, 2006.
108. Harris, D. C. *Análise Química Quantitativa*, 8th ed.; LTC, 2012.
109. Ebdon, L.; Evans, E. H.; Fischer, A.; Hill, S. J. *An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*; WILEY-VCH, 1998.
110. Javier Aller, A. *Fundamentals of Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry: A Look Inside the Fundamental Processes in ETAAS*, 1st ed.; World Scientific, 2018.
111. Schlemmer, G.; Radziuk, B. *Analytical Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry: A Laboratory Guide*, 1st ed.; Birkhäuser Basel, 1999.
112. Welz, B.; Sperling, M. *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rd ed.; WILEY-VCH: Uberlingen, 1999.
113. Thomas, R. J. *Measuring Heavy Metal Contaminants in Cannabis and Hemp*, 1st ed.; Taylor & Francis, 2020.
114. Dutra, M. H. D. Avaliação de Métodos de Preparo de Amostras Para Decomposição de Biodiesel e Determinação de Elementos Químicos Por Espectrometria Atômica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2016.
115. Staš, M.; Kubička, D.; Chudoba, J.; Pospíšil, M. *Energy and Fuels* **2014**, 28 (1), 385–402.
116. Tosato, F.; Barros, E. V.; Cunha, D. A.; Santos, F. D.; Corrêa, T.; Nunes, A.; Justrow, I.; Silverol, M. A.; Pinheiro, L. U.; Seabra, A. C.; Filgueiras, P. R.; Neto, A. C.; Wang, L.; Ferreira, E. C.; Romão, W. *Quim. Nova* **2020**, 43 (2), 155–167.
117. Sugumaran, V.; Prakash, S.; Ramu, E.; Arora, A. K.; Bansal, V.; Kagdiyal, V.; Saxena, D. *J. Chromatogr. B* **2017**, 1058, 47–56.
118. Padivitage, N. L. T.; Smuts, J. P.; Armstrong, D. W. Water Determination. In *Specification of Drug Substances and Products: Development and Validation of Analytical Methods*; Elsevier, 2013; p 380.
119. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*, 8th ed.; Thomson, 2006.
120. Bruttel, P.; Schlink, R. *Water Determination By Karl Fischer Titration*; 2010.
121. Cunha, F. A. S.; Sousa, R. A.; Harding, D. P.; Cadore, S.; Almeida, L. F.;

- Araújo, M. C. U. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 727, 34–40.
122. Luz, M. S.; Oliveira, P. V. *Fuel* **2014**, 116, 255–260.
123. Almeida, A. L. O. de. Diagrama de Fases Do Sistema Nonilfenol Etoxilado / Solução de Glicerina / Diesel, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, 2017.
124. Lobo, F. A.; Goveia, D.; Oliveira, A. P. d.; Pereira-Filho, E. R.; Fraceto, L. F.; Filho, N. L. D.; Rosa, A. H. *Fuel* **2009**, 88 (10), 1907–1914.
125. Zhou, L.; Zhang, J.; Xing, L.; Zhang, W. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, 110 (1), 493–512.
126. Taha, A.; Ahmed, E.; Ismaiel, A.; Ashokkumar, M.; Xu, X.; Pan, S.; Hu, H. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, 105, 363–377.
127. Nii, S.; Kikumoto, S.; Tokuyama, H. *Ultrason. Sonochem.* **2009**, 16 (1), 145–149.
128. Junior, A. M. S. Aplicação Do Ultrassom Na Coalescência de Emulsões Água Em Óleo, Universidade de São Paulo - USP, 2013.
129. Capelo-Martinez, J. L. *Ultrasound in Chemistry*, 1st ed.; WILEY-VCH, 2009.
130. Santos, H. M.; Capelo, J. L. *Talanta* **2007**, 73 (5), 795–802.
131. Goddeeris, C.; Cuppo, F.; Reynaers, H.; Bouwman, W. G.; Van Den Mooter, G. *Int. J. Pharm.* **2006**, 312 (1–2), 187–195.
132. Balcaen, M.; De Neve, L.; Dewettinck, K.; Van der Meeren, P. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2021**, 42 (6), 869–879.
133. Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*, 1st ed.; Plenum Press, 1985.
134. Santos, N. K. V.; Santos, L.; Damin, I. C. F.; Vale, M. G. R.; Dessuy, M. B. *J. Food Compos. Anal.* **2022**, 111, 104625.
135. Stephan, C. H.; Fournier, M.; Brousseau, P.; Sauvé, S. *Chem. Cent. J.* **2008**, 2 (1), 1–8.
136. Duarte, A. T.; Dessuy, M. B.; Vale, M. G. R.; Welz, B.; De Andrade, J. B. *Talanta* **2013**, 115, 55–60.
137. Wang, P.; Majidi, V.; Holcombe, J. A.; Majidi, V. *Anal. Chem.* **1989**, 61 (23), 2652–2658.
138. Akman, S.; Genç, Ö.; Bektaş, S. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **1991**, 46 (14), 1829–1839.

139. Guilbault, G. G.; Hjelm, M. *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61 (9), 1657–1664.
140. Voth, L. M. *Dealing with Matrix Interferences in the Determination of the Priority Pollutant Metals by Furnace AA*; 2010.
<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/aa035.pdf>.
141. Volynskii, A. B. *J. Anal. Chem.* **2003**, 58 (10), 905–921.
142. Rubio, R.; Sahuquillo, A.; Rauret, G.; Quevauviller, P. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1992**, 47 (2), 99–128.
143. Brum, D. M.; Lima, C. F.; Robaina, N. F.; Fonseca, T. C. O.; Cassella, R. J. *Spectrochim. Acta - Part B* **2011**, 66 (5), 338–344.
144. dos Santos, D. S. S.; Teixeira, A. P.; Barbosa, J. T. P.; Ferreira, S. L. C.; Korn, M. das G. A.; Teixeira, L. S. G. *Spectrochim. Acta - Part B* **2007**, 62 (9), 1072–1077.
145. Jiang, H.; Yan, R.; Cai, C.; Chen, X.; Zhao, F.; Fan, L.; Xu, C. C.; Yang, W. *Fuel* **2021**, 303, 121235.
146. Adolfo, F. R.; Nascimento, P. C.; Brudi, L.; Bohrer, D.; Carvalho, L. M.; Cravo, M. C. C.; Nascimento, L. *Talanta* **2021**, 234, 122586.
147. Almeida, J. S.; Brandão, G. C.; Dos Santos, G. L.; Teixeira, L. S. G. *Anal. Methods* **2016**, 8 (15), 3249–3254.
148. Barela, P. S. Desenvolvimento de Métodos de Preparo de Amostras Para Posterior Determinação de Elementos Traço Em Biodiesel Por Espectrometria de Massa Com Setor Eletromagnético Com Plasma Indutivamente Acoplado (SF-ICP-MS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2017.