

## Otimização de Diferentes Procedimentos de Preparo de Amostras: Aplicação na Extração de Antioxidantes Presentes em Biodiesel

Adriana Garabini de Freitas Andrade<sup>a</sup>, Ricardo Pini Caramit<sup>a</sup>, Tatiane Alfonso de Araújo<sup>b</sup>, Luiz Henrique Viana<sup>a</sup>, João Batista Gomes de Souza<sup>c</sup>, Magno A. Gonçalves Trindade<sup>c\*</sup>, Valdir Souza Ferreira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Filinto Muller, 1555, Caixa postal 549, CEP 79074-460, Campo Grande-MS.

<sup>b</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul, Campus Aquidauana. Rua Cinco, s/n, Bairro Icarai, CEP 79200-000, Aquidauana-MS

<sup>c</sup>Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados - Itahum, Km 12, Caixa Postal 364, CEP 79804-970, Dourados-MS.

Article history: Received: 13 November 2014; revised: 27 April 2015; accepted: 18 May 2015. Available online: 23 June 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v7i2.672>

**Abstract:** In this work, different procedures were compared for the extraction of synthetic antioxidants such as propyl gallate (PG), tert-Butylhydroquinone (TBHQ), 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and 3,5-di-tert-butyl-4 hydroxytoluene (BHT) from biodiesel samples. The efficiency of target procedures was tested using liquid-liquid extraction and solid phase extraction containing different stationary phase. To accomplish this efficiency and determine the antioxidants, a method based on high performance liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC/DAD) was optimized. In liquid-liquid extraction was used acetonitrile and *n*-hexane, however, only acetonitrile presented selectivity, able to extract just PG and BHA, with recovery between 78.3 and 96.0%. Using solid phase extraction cartridges containing C-18 as stationary phase, only the PG and BHA were extracted, which the recovery was between 52.4 and 99.7%. Moreover, the macroporous poly(divinylbenzene-co-*N*-vinylpyrrolidone) polymer presented satisfactory results for the extraction of PG and BHA with recovery between 77.3 and 103%. All these procedures provided elimination of the sample interferences, allowing recovery with coefficients of variation always lower than 1.00%. However, the comparison of liquid-liquid extraction and solid phase extraction techniques proved that there are many difficulties in extracting, with precision and accuracy, the PG, TBHQ, BHA and BHT antioxidants contained simultaneously in complex samples such as biodiesel. These difficulties are increased when the interest is to reduce the costs of analysis by reducing organic solvent extractors and propose extraction techniques with considerable environmental benefits.

**Keywords:** biodiesel; antioxidants; liquid chromatography; liquid-liquid extraction; solid phase extraction

### 1. INTRODUÇÃO

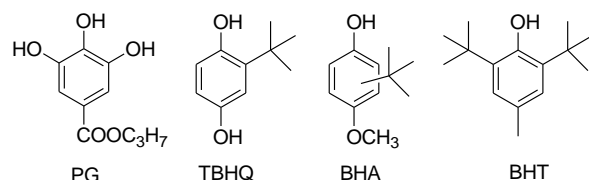
Parte da energia necessária para o desenvolvimento e progresso da população mundial provém de fontes não renováveis e poluentes como, petróleo, carvão mineral e gás natural, as quais já tiveram o seu esgotamento anunciado. Assim, a busca por fontes de energia renováveis e menos poluentes teve um crescimento exponencial nos últimos anos, tendo a energia derivada da biomassa como uma opção para contribuição ao desenvolvimento sustentável. Neste cenário, no mercado de combustíveis derivados de fontes renováveis, o biodiesel tem uma importante aplicação [1-4]. O biodiesel é um combustível biodegradável e

renovável, pois a matéria prima da sua produção são óleos vegetais, resíduos de óleo de cozinha e gorduras animais. Dentre outras vantagens, enfatiza-se que o seu ciclo produtivo diminui a emissão de gases causadores do efeito estufa [5, 6].

No Brasil, de acordo com a Resolução ANP nº 4, o teor de biodiesel adicionado obrigatoriamente ao diesel de petróleo é de 6,0% (v/v) [7, 8]. Apesar de apresentar inúmeras vantagens, entre as quais, alto número de cetano, biodegradabilidade e obtenção a partir de fontes renováveis [3], o biodiesel possui tendência à degradação oxidativa, pois os óleos empregados na sua produção contêm insaturações que reagem com radicais livres formados durante o

\*Corresponding author. E-mail: [magnotr@gmail.com](mailto:magnotr@gmail.com)

processo degradativo. Ademais, a exposição à luz, ao calor e a resíduos de metais contribui para o processo de degradação mediante reações catalíticas [1]. No entanto, este processo de degradação, que prejudica a qualidade do biodiesel, pode ser minimizado, pela adição de substâncias antioxidantes naturais como gossipol e  $\alpha$ -tocoferol ou sintéticas como propil galato (PG), *tert*-butil-hidroquinona (TBHQ), 2- e 3- *tert*-butil-4-hidroxianisol (BHA) e 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxitolueno (BHT) (Figura 1) [9].



**Figura 1.** Estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos.

A estabilidade do biodiesel em relação à degradação oxidativa e a ação dos antioxidantes no controle dessa degradação são fatores que influenciam diretamente na qualidade do biocombustível. Assim, diversos trabalhos são desenvolvidos dedicando-se ao desenvolvimento de métodos analíticos que permitem identificar e quantificar estes antioxidantes em matrizes como óleos, gorduras, cosméticos, produtos alimentícios e biodiesel. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) juntamente com a detecção por absorção ultravioleta [10], detecção eletroquímica [11], detecção coulométrica [12] e detecção espectrofotométrica [13] tem sido utilizada para a determinação destes antioxidantes em diversos tipos de matrizes.

Dentre as amostras alimentícias, farmacêuticas, cosméticas, oleaginosas entre outras, que apresentam necessidade de adição de antioxidantes para prevenir a sua oxidação, a complexidade destas não permite que sejam injetadas diretamente nos sistemas cromatográficos. Em geral, estas amostras requerem um tratamento prévio para a remoção de substâncias interferentes, extração da substância de interesse analítico ou concentração desse analito diluído ao nível dos limites para sua determinação [14]. A preparação de amostras complexas, como o biodiesel, antes da determinação por técnicas analíticas, em particular técnicas cromatográficas, deve ser realizada a fim de extrair o analito de interesse e eliminar os efeitos de interferência dos componentes associados. A remoção de interferentes de uma amostra pode auxiliar na

performance do sistema cromatográfico, evitando deterioração dos componentes metálicos bem como evitar problemas de co-eluição de compostos indesejáveis que prejudicam a separação e a detecção. Ademais, quando a análise envolve amostras contendo apenas traços do analito de interesse, a etapa de preparo da amostra além de deixar o analito em uma condição compatível com o sistema cromatográfico também é de fundamental importância para pré-concentrá-lo e melhorar o limite de detecção da técnica analítica [14].

A extração líquido-líquido é uma técnica muito utilizada para extrair – de amostras de óleos, alimentícias entre outras de alta complexidade –, substâncias com polaridade intermediária como TBHQ, BHA, BHT e PG. Dados publicados anteriormente relatam que, usando o metanol como fase orgânica extratora, obtêm-se valores de recuperação entre 89% e 103% [15]. Em outra publicação foi divulgado que para amostras sólidas como patês, que contenham óleos, foi necessária a utilização de uma mistura de *n*-hexano saturada com acetonitrila para a extração destes antioxidantes e obter eficiência de recuperação entre 78% e 100% [16]. Solventes orgânicos como hexano e acetonitrila, são usados na extração destes antioxidantes, de amostras oleaginosas, seguindo o procedimento descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) [17], os quais possibilitam obtenção de valores de recuperação entre 75% e 99% [16, 18, 19]. Entretanto, destaca-se como ponto negativo destas metodologias o consumo excessivo de solventes orgânicos extratores, os quais aumentam os custos das análises além de contrariar os princípios básicos de “química verde”.

Para atender aos objetivos de extração do analito de interesse, em amostras complexas como as oleaginosas, e obter uma fração purificada antes da detecção por técnicas analíticas, vários métodos de pré-tratamento são desenvolvidos com atenção especial aos métodos que possibilitem a extração simultânea de um grupo de substâncias com polaridades distintas. Neste sentido, a extração em fase sólida (EFS), mesmo sendo uma das técnicas mais eficientes na purificação de analitos de interesse, presentes nas mais variadas matrizes, não tem sido satisfatoriamente empregada para a extração de antioxidantes em amostras oleaginosas. Destaca-se como exemplo de ineficiência desta técnica, a metodologia desenvolvida por Delgado-Zamarreño e colaboradores [20] para extrair os antioxidantes dodecil galato (DG), BHA e BHT de amostras de

óleos vegetais, tendo como solventes extratores o hexano, o metanol e a acetonitrila. Neste trabalho, os autores utilizaram como materiais sorventes: a sílica, a qual possibilitou recuperar DG, BHA e BHT em percentagens de 80%, 58% e 20%, respectivamente, e o octadecilsilano (C-18) que permitiu recuperações de 40% para o DG, 60% para o BHA e 40% para o BHT.

A técnica de extração em fase sólida usando como fase estacionária o copolímero macroporoso de divinilbenzeno e *n*-vinilpirrolidona (CMDDB-NVP) também foi utilizada para extrair os antioxidantes TBHQ, BHA, BHT e seus metabólitos de amostras de água de esgotos e rios antes da determinação por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas [21]. Na metodologia proposta, empregou-se como solvente de eluição a mistura de acetato de etila, metanol e água. Nos testes de eficiência do procedimento de extração, obtiveram-se recuperações para TBHQ e BHA entre 70% e 115%, respectivamente, entretanto, para o BHT o valor máximo de recuperação foi de apenas 61% [21]. Novamente, a extração não foi eficiente para todos os antioxidantes estudados, entretanto, enfatizou-se como vantagens da metodologia a redução de resíduos de solvente orgânico, o custo da análise e a eliminação de etapas de evaporação de solvente. Em outro trabalho foi demonstrado que o polímero de estireno-divinilbenzeno (SDB) utilizado como material sorvente é o mais apropriado para preconcentrar o BHT e extraí-lo de água de rio e água potável, no qual o procedimento desenvolvido permitiu recuperação deste analito acima de 80% [22].

Mesmo tendo observado a existência de inúmeros trabalhos utilizando métodos de extração de antioxidantes sintéticos em diferentes amostras alimentícias constata-se que, não há trabalhos dedicados na aplicação destes métodos para extrair estes analitos de amostras de biodiesel. Além disso, verificou-se que há muita dificuldade em propor um método altamente eficiente – com redução de solventes orgânicos extratores – e obter resultados satisfatórios para a extração simultânea destes analitos utilizando apenas um procedimento de extração e/ou um tipo de sorvente para compor a fase estacionária. Assim, no presente trabalho teve-se como objetivo, além da extração líquido-líquido, comparar diferentes procedimentos de extração dos antioxidantes PG, TBHQ, BHA e BHT de amostras de biodiesel, testando-se a eficiência da EFS e diferentes tipos de fase estacionária. Para acompanhar a eficiência destes procedimentos e determinar os antioxidantes de

interesse, empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos (CLAE/DAD) como técnica analítica de quantificação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Reagentes e soluções padrão

Os antioxidantes propil galato (PG, 98%, Across Organics), *tert*-butil-hidroquinona (TBHQ, 97%, Across Organics), 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol (BHA, 96%, Across Organics) e 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxitolueno (BHT, 99,8%, Across Organics) foram dissolvidos em metanol grau CLAE (J. T. Baker) para o preparo de soluções estoques com concentração de 500 mg L<sup>-1</sup>. As soluções estoques foram estocadas sob 4 °C durante 30 dias e as soluções de trabalho foram obtidas a partir de diluição, em metanol, das soluções estoque padrão.

Como fase móvel utilizou-se metanol grau CLAE (J. T. Baker), água ultrapurificada (Elga Classic) e ácido acético glacial suprapuro (Vetec). Hexano, acetonitrila, metanol todos obtidos da J. T. Baker e acetato de etila grau P.A. adquirido da Synth foram empregados nos procedimentos de extração a líquido e em fase sólida.

As amostras de biodiesel utilizadas no desenvolvimento do método foram cedidas por uma empresa produtora de biodiesel no estado de Mato Grosso do Sul e coletadas pelo laboratório de combustíveis da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (LABCOM - UFMS).

As amostras de biodiesel, isentas dos antioxidantes de interesse, foram devidamente enriquecidas com os referidos antioxidantes até obter, separadamente, a concentração final de 1000 mg kg<sup>-1</sup> de PG, TBHQ, BHA e BHT. A partir destas soluções foram preparadas as amostras, simultaneamente, os quatro antioxidantes nas concentrações de 50, 100, 500 e 1000 mg kg<sup>-1</sup>, que posteriormente, foram submetidas aos procedimentos de extração por líquido-líquido e em fase sólida.

### Equipamentos e procedimento analítico

A separação e quantificação dos antioxidantes selecionados para o trabalho foi realizada com o auxílio de um sistema cromatográfico líquido de alta eficiência (CLAE) modelo Shimadzu equipado com

bomba multicanal LC 20AT, detector de arranjo de diodos SPD-20A, autoinjeter Sil-20AC, degaseificador DGU-20A5 e comunicador entre módulos CBM-20A. Os analitos foram separados através de uma coluna Stable Bond Zorbax fase reversa C-18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) (Agilent HP).

A otimização da eluição, empregando o modo gradiente, foi baseado no método sugerido por Takemoto e colaboradores [18] e Tagliabue e colaboradores [25]. Nestes procedimentos, a fase móvel foi formada por mistura de metanol:água (v/v) com 1,0% (v/v) de ácido acético sob a vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e injeção de 20 µL de amostra. A composição de metanol foi de 55%, entre 0 e 3 min, atingindo 100% em 3 min., sendo mantida por 6 min. Após este tempo, estabilizou-se o sistema durante 5 minutos com a porcentagem de metanol mantida em 55%, obtendo um tempo total de análise de 13 minutos.

#### Tratamentos das amostras para análise pelo sistema CLAE/DAD

Os métodos adequados à determinação dos antioxidantes em biodiesel consistiram-se na avaliação do tratamento das amostras por extração líquido-líquido e extração em fase sólida. Para os procedimentos de extração em fase sólida foram testados cartuchos contendo três tipos de fase estacionária distintas, C-18 (SPE-ed Applied Separation 1000 mg), copolímero macroporoso de divinilbenzeno-*n*-vinilpirrolidona (Oasis HLB Waters 200 mg) e polímero de estireno divinilbenzeno (Strata SDB-L Phenomenex 200 mg).

A extração líquido-líquido foi adotada como uma das formas de tratamento da amostra, sendo adaptada do procedimento descrito por Peng-Peng e colaboradores [24], os quais determinaram TBHQ em amostras de óleos vegetais comestíveis. Neste procedimento, a massa de 0,2000 g da amostra enriquecida com o antioxidante em estudo foi pesada em um tubo de ensaio e dissolvida com 600 µL de *n*-hexano, com auxílio de banho ultrassônico durante 2 minutos. A esta solução, 2,0 mL do solvente de extração, metanol ou acetonitrila, foram adicionados e em seguida, a mistura resultante foi centrifugada sob 4.000 rpm por 5 minutos. A fase hexânica foi retirada e transferida a outro tubo de ensaio e, sobre a mesma, adicionou-se 2,0 mL de solvente de extração, centrifugando-a novamente sob as mesmas condições

da fase anterior. Para continuidade do procedimento, desprezou-se a fase hexânica e os extratos do solvente de extração foram combinados e submetidos ao fluxo de N<sub>2</sub> gasoso até quase secura, para então, reconstituição do resíduo obtido em 5,0 mL de metanol, filtração em membrana filtrante 0,45 µm (Millipore) e análise por CLAE/DAD. Para cada amostra, realizou-se o procedimento em triplicata e, cada replicata foi analisada três vezes pelo sistema cromatográfico.

Para desenvolvimento dos procedimentos de extração em fase sólida baseou-se em métodos pré-existent e reportados em diversos trabalhos [20-23]. No primeiro procedimento de extração em fase sólida testado (EFS-1), foram empregados dois tipos de cartuchos, um contendo 1000 mg de fase estacionária constituída por C-18 e o outro contendo 200 mg da fase estacionária copolímero macroporoso de divinilbenzeno-*n*-vinilpirrolidona (CMDB-NVP), os quais foram previamente condicionados com 3,0 mL de metanol, seguido de 3,0 mL da mistura de *n*-hexano/acetato de etila (1:1, v/v). Posteriormente, 0,2000 g da amostra de biodiesel enriquecida com 500 mg kg<sup>-1</sup> de PG e de BHT, 666 mg kg<sup>-1</sup> de TBHQ e 333 mg kg<sup>-1</sup> de BHA foi dissolvida em 10 mL da mistura hexano/acetato de etila (1:1, v/v) e aplicada sobre as fases estacionárias condicionadas. A limpeza dos cartuchos foi realizada com 3,0 mL de acetato de etila:metanol 9:1 (v/v), secando as fases estacionárias sob pressão ambiente durante 15 minutos e, posterior, eluição dos analitos com 5,0 mL de metanol. A solução obtida foi filtrada em membrana filtrante 0,45 µm (Millipore) e injetada no sistema cromatográfico, no qual a quantificação dos antioxidantes foi realizada pelo método do padrão externo.

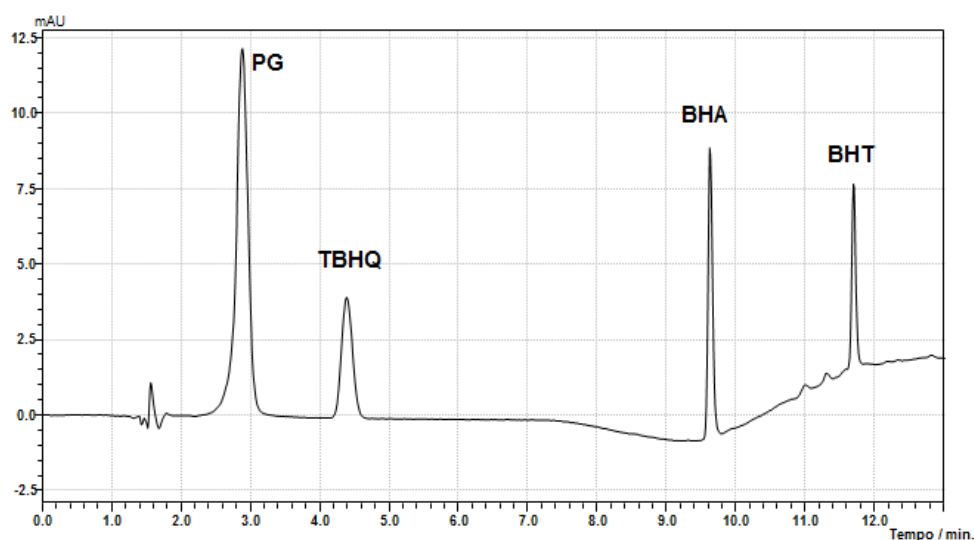
No segundo procedimento (EFS-2), realizou-se algumas alterações nas etapas do procedimento EFS-1, empregando-se ainda, um cartucho de extração em fase sólida contendo 200 mg da fase estacionária de polímero de estireno-divinilbenzeno (SDB). Antes da utilização, as fases estacionárias foram previamente condicionadas, primeiro com 3,0 mL de metanol e, a seguir, por 3,0 mL de acetato de etila, finalizando com 3,0 mL de *n*-hexano. Na etapa seguinte, 0,200 g da amostra de biodiesel enriquecida com 500 mg kg<sup>-1</sup> de PG e de BHT, 666 mg kg<sup>-1</sup> TBHQ e 333 mg kg<sup>-1</sup> BHA, foi dissolvida em 10 mL de *n*-hexano e percolada sobre os cartuchos empregados no procedimento 2 (EFS-2). A etapa de limpeza do cartucho foi realizada com 1,0 mL de *n*-hexano. Após a limpeza, o cartucho foi submetido à secagem sob vácuo por 4 minutos, para posterior eluição dos



analitos com 5,0 mL de metanol. A solução obtida foi filtrada em membrana filtrante 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) e injetada no sistema cromatográfico, no qual a quantificação dos antioxidantes foi realizada pelo método do padrão externo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Otimização das condições cromatográficas



**Figura 2.** Cromatograma registrado para detecção dos antioxidantes na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições: eluição em  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$  (99:1, v/v); programação do gradiente: 0 - 3 min 55,0% de MeOH, 3 - 6 min 55,0 - 100% de MeOH, 6 - 12 min 100% de MeOH, 12 - 13 min 100 - 55,0% de MeOH, 13 - 18 min 55,0% de MeOH, sob vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e detecção em 280 nm. Volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ .

Para testar a eficiência de cada procedimento de extração, inicialmente, estudou-se a faixa linear de trabalho mediante a construção de curvas analíticas medindo-se área do pico em função da concentração dos antioxidantes estudados. Neste estudo, verificou-se o intervalo de concentração de trabalho para a adição dos antioxidantes nas amostras bem como o intervalo de concentração, no qual foi possível quantificar os antioxidantes com precisão e exatidão aceitável. É importante ressaltar que a adição de antioxidantes ao biodiesel comercial é realizada em concentrações superiores a  $200 \text{ mg Kg}^{-1}$  [28-30]. Portanto, para as amostras de biodiesel aditivadas com concentrações superiores a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  foram feitas diluições para atender ao intervalo de concentração de trabalho estabelecido. Utilizando-se a melhor condição de trabalho, tal como definida na Figura 2, verificou-se linearidade no intervalo de concentração de trabalho, a qual foi de  $1,00$  a  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 3).

Na Figura 2, verifica-se que as adaptações efetuadas no método desenvolvido por Takemoto e colaboradores [18] proporcionaram separar satisfatoriamente os antioxidantes PG ( $t_R = 2,87 \text{ min.}$ ), TBHQ ( $t_R = 4,37 \text{ min.}$ ), BHA ( $t_R = 9,62 \text{ min.}$ ), e BHT ( $t_R = 11,68 \text{ min.}$ ). Assim, este método foi empregado para acompanhar a eficiência dos procedimentos de extração com o objetivo de determinar estes antioxidantes em amostras de biodiesel.

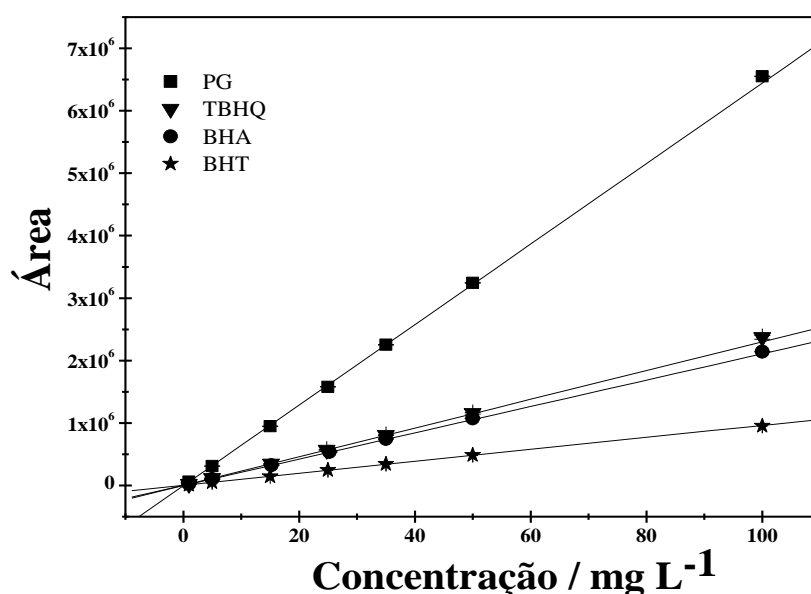
As equações de regressão linear para todos os antioxidantes estudados podem ser obtidas a partir dos valores dos parâmetros apresentados na Tabela 1. Os coeficientes de correlação linear situaram-se acima dos valores estabelecidos pela ANVISA e INMETRO [26, 27]. Com os parâmetros extraídos das curvas e reunidos na Tabela 1, estimaram-se os limites de detecção (LD) mediante o uso da seguinte relação matemática:  $3 \times \text{SD}_A / b$ , em que  $\text{SD}_A$  representa a estimativa do erro relativo ao coeficiente linear e  $b$  a inclinação da curva analítica.

#### Otimização do procedimento de extração líquido-líquido

Para a aplicação do procedimento de extração líquido-líquido utilizando o método proposto por Peng-Peng e colaboradores [24] não foi possível usar o etanol ou metanol como solvente extrator. Neste caso, após a dissolução do biodiesel em *n*-hexano e, posterior, adição de metanol ou etanol houve a

formação de uma única fase de difícil separação, mesmo após minucioso processo de centrifugação. Portanto, os estudos para avaliar a eficiência da extração líquido-líquido, mediante a quantificação dos antioxidantes nas amostras de biodiesel, foram realizados utilizando apenas a acetonitrila como solvente de extração, a qual permaneceu adequadamente imiscível com a fase hexano-biodiesel. Aplicando este procedimento para extração do PG, TBHQ, BHA e BHT nas amostras de biodiesel contaminadas com, respectivamente, 50, 500 e 1.000

mg kg<sup>-1</sup> destes antioxidantes, verificou-se seletividade para extração apenas do PG, TBHQ e BHA. Utilizando-se a recuperação como parâmetro de avaliação da eficiência do procedimento, valores entre 78,3% e 96,0% foram obtidos (Tabela 2), os quais evidenciam que o método é eficiente na extração destes antioxidantes nas amostras de biodiesel. Ademais, os valores de coeficientes de variação situados entre 0,02% e 0,55% são aceitáveis e demonstram que o método é preciso tanto na extração quanto na detecção de PG, TBHQ e BHA (Tabela 2).



**Figura 3:** Curvas analíticas obtidas para os padrões dos antioxidantes no intervalo de concentração de 1,00 a 100,0 mg L<sup>-1</sup>. Condições de trabalho: Idem Figura 2.

**Tabela 1.** Parâmetros obtidos para as curvas analíticas apresentadas na Figura 3.

Parâmetros	PG	TBHQ	BHA	BHT
Faixa de aplicação (mg L <sup>-1</sup> )	1,00 – 100,0	1,00 – 100,0	1,00 – 100,0	1,00 – 100,0
Coefficiente de correlação linear ( <i>r</i> )	0,9998	0,9999	0,9998	0,9999
Intercepto ( <i>b</i> )	- 3879,0	-152,9	1,70	1609,5
Inclinação ( <i>a</i> )	64471,0	22990,4	21085,7	9599,5
LD (mg L <sup>-1</sup> )	0,06	0,02	0,06	0,24
LQ (mg L <sup>-1</sup> )	0,20	0,06	0,18	0,73

Os dados de recuperação reunidos na Tabela 2 revelam ainda que, o procedimento de extração líquido-líquido, mesmo com as adaptações não foi eficiente para extrair satisfatoriamente o BHT das amostras de biodiesel, possivelmente, pela presença de contaminantes extraídos concomitantemente, os quais promoveram maior interferência sobre a detecção, fato que pode ser observado pelo tempo de retenção (*t<sub>R</sub>*) da identificação deste antioxidante.

Destaca-se neste procedimento que os valores de recuperação e precisão são próximos aos reportados na literatura para matrizes alimentícias. No trabalho de Peng-Peng e colaboradores [24], o qual foi adaptado e utilizado como base para o presente procedimento, o antioxidante TBHQ foi recuperado de amostras de óleos vegetais comestíveis com valores entre 95,4% e 96,3% com precisão de 8,30% e 9,80%, respectivamente. Em outra publicação, Sin e

colaboradores [31] também obtiveram valores de recuperação aceitáveis para a extração de PG, BHA e BHT em amostras de óleos comestíveis. Neste procedimento, utilizou-se o *n*-hexano e a acetonitrila como a fase orgânica extratora, os quais, segundo os autores, foram eficientes para extrair estes

antioxidantes com valores de 96,6%, 97,6% e 75,8%, respectivamente. Ademais, os valores para o desvio padrão relativo foram de 1,90%, 5,71% e 4,71% para o PG, o BHA e o BHT, respectivamente, indicando que o método foi suficientemente preciso.

**Tabela 2.** Resultados obtidos ( $n = 3$ ) para os ensaios de recuperação do método de extração líquido-líquido e quantificação de PG, TBHQ, BHA e BHT em amostras de biodiesel.

Antioxidantes	C. A. (mg kg <sup>-1</sup> )	C <sub>F</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	C.V. (%)
PG	50	2,0	87,4	0,22
	500	20,0	93,5	0,10
	1000	40,0	95,9	0,06
TBHQ	50	2,0	78,3	0,55
	500	20,0	82,3	0,27
	1000	40,0	86,9	0,17
BHA	50	2,0	90,3	0,15
	500	20,0	92,1	0,02
	1000	40,0	94,6	0,04
BHT	50	2,0	N.D.	N.D.
	500	20,0	N.Q.	N.Q.
	1000	40,0	N.Q.	N.Q.

C.A.: Concentração adicionada; C.V.: Coeficiente de Variação; N.D.: Não Detectado; N.Q.: Não Quantificado; C<sub>F</sub>: Concentração final esperada se o procedimento recuperasse completamente (100%) a massa de antioxidante adicionada.

Por fim, no estudo de Takemoto e colaboradores [18], foi relatado que o método de extração líquido-líquido utilizando o *n*-hexano e a acetonitrila como solventes extratores, foi possível extrair satisfatoriamente os antioxidantes DG, PG, TBHQ, BHA e BHT de amostras de óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas. No trabalho, os autores mostraram que na recuperação destes antioxidantes, obtêm-se valores compreendidos entre 94% e 101% para PG; 90% e 97% para TBHQ; 96% e 108% para BHA e entre 92% e 101% para BHT.

Diferentemente do método proposto por Peng-Peng e colaboradores [24], no qual há um consumo reduzido de solventes orgânicos extratores (apenas 2 mL), os demais procedimentos não estão condizentes com os princípios de “química verde” devido ao alto consumo destes solventes extratores (acetonitrila, metanol e hexano). Como exemplo, destacam-se os trabalhos desenvolvidos por Takemoto e colaboradores [18] bem como Sin e colaboradores [31], os quais utilizaram cerca de 150 mL dos solventes extratores para alcançarem níveis aceitáveis de recuperação dos antioxidantes nas matrizes estudadas. Com o objetivo de diminuir os custos de análises e buscar maiores benefícios ambientais, os procedimentos envolvendo consumo excessivo de

solventes orgânicos foram evitados. Portanto, concomitantemente as adaptações realizadas no procedimento de extração proposto por Peng-Peng e colaboradores, testou-se a extração dos antioxidantes de interesse em colunas de extração em fase sólida mediante o uso dos procedimentos EFS-1 e EFS-2.

#### Otimização do procedimento de extração em fase sólida (EFS-1 e EFS-2)

O desenvolvimento dos procedimentos EFS-1 e EFS-2, com o uso de fases estacionárias composta de C-18, CMDDB-NVP e SDB, foi semelhante aos estudos realizados com a extração líquido-líquido no que refere-se aos níveis de concentração. Inicialmente, testou-se a possibilidade de retenção dos antioxidantes PG, TBHQ, BHT e BHA nos três diferentes tipos de fases estacionárias estudadas para, posterior extração com o uso dos procedimentos EFS-1 e EFS-2. Neste caso, o nível de concentração estudado para cada antioxidante adicionado nas amostras de biodiesel foi de 50 mg kg<sup>-1</sup>. A partir dos dados de recuperação reunidos na Tabela 3, observa-se que as fases estacionárias de C-18 e CMDDB-NVP foram efetivas apenas para a extração de PG, TBHQ e BHA com valores superiores a 87%. Por outro lado, a

fase estacionária contendo o SDB não foi suficientemente eficiente para a extração simultânea dos três antioxidantes, extraindo apenas o PG e o TBHQ das amostras de biodiesel analisadas.

**Tabela 3.** Recuperação dos antioxidantes adicionados a uma concentração de 50 mg kg<sup>-1</sup> para cada um dos antioxidantes (PG, TBHQ BHA, BHT) nas amostras de biodiesel utilizando os procedimentos EFS-1 e EFS-2

Procedimentos	Fase estacionária	Recuperação (%)			
		PG	TBHQ	BHA	BHT
EFS-1	C-18	87,3	99,9	98,3	N.E.
	CMDB-NVP	96,7	107	105	N.E.
EFS-2	SDB	78,1	86,1	N.E.	N.E.

CMDB-NVP: Copolímero macroporoso de Divinilbenzeno-n-vinilpirrolidona; SDB: Polímero de estireno-divinilbenzeno; N.E.: Não Extraído.

Em todos os casos, em nenhuma das fases estacionárias utilizadas o BHT foi extraído das amostras de biodiesel, mesmo otimizando os procedimentos para melhorar a seletividade desses materiais sorventes. Além disso, apenas as fases estacionárias C-18 e CMDB-NVP apresentaram eficiência suficiente para a retenção e posterior extração dos antioxidantes PG, TBHQ e BHA presentes nas amostras de biodiesel analisadas. Estes resultados são concordantes com a maioria dos trabalhos anteriormente publicados, os quais trazem uma discrepância significativa nos valores de recuperação durante a extração simultânea de PG, TBHQ, BHT e BHA com o uso de apenas um procedimento de extração ou apenas um tipo de fase estacionária. Assim, considerando que, no procedimento proposto, a eficiência na extração foi limitada às duas fases estacionárias (C-18 e CMDB-

NVP) e, que, apenas o PG, TBHQ e BHA foram seletivamente extraídos das amostras de biodiesel, os estudos seguintes foram conduzidos tendo como sorvente C-18 e CMDB-NVP e, como analito, os antioxidantes supramencionados.

É importante considerar ainda que, o PG foi o analito que apresentou menor valor de recuperação em todas as fases estacionárias estudadas, possivelmente, pela baixa concentração deste na amostra que foi de 50 mg kg<sup>-1</sup>. Portanto, optou-se por trabalhar com amostras de biodiesel enriquecidas com outros níveis de concentrações dos antioxidantes PG, TBHQ e BHA, os quais foram de 50, 100, 500 e 1.000 mg kg<sup>-1</sup>. Na Tabela 4, é apresentada uma análise comparativa da performance da fase estacionária C-18 na extração destes antioxidantes em diferentes níveis de concentração.

**Tabela 4.** Resultados obtidos (n = 3) para os ensaios de recuperação de PG, TBHQ e BHA de amostras de biodiesel utilizando o método de extração fase sólida com fase estacionária composta por C-18 e determinação por CLAE/DAD.

Antioxidante	C. A. (mg kg <sup>-1</sup> )	C <sub>F</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	C.V. (%)
PG	50	2,0	52,9	0,93
	100	4,0	61,7	0,31
	500	20,0	86,1	0,07
	1000	40,0	86,3	0,09
TBHQ	50	2,0	89,5	1,23
	100	4,0	75,9	0,52
	500	20,0	84,5	0,13
	1000	40,0	99,7	0,21
BHA	50	2,0	81,5	0,32
	100	4,0	77,7	0,12
	500	20,0	94,8	0,08
	1000	40,0	76,4	0,16

C.A.: Concentração adicionada; C.V.: Coeficiente de Variação; C<sub>F</sub>: Concentração final esperada se o procedimento recuperasse completamente (100%) a massa de antioxidante adicionada.



Novamente, observa-se que nas amostras contendo concentrações de 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup> dos antioxidantes de interesse, a fase estacionária C-18 não extraiu eficientemente o PG, tendo sido obtidos valores de recuperação inferiores a 62%. Todavia, para os níveis de concentrações de 500 e 1.000 mg kg<sup>-1</sup> os valores de recuperação situaram-se acima de 80% com destaque para os coeficientes de variação que foram menores que 0,30%. Essa variação na recuperação em baixos valores de concentração pode estar relacionada com as semelhanças na polaridade da fase estacionária, do solvente de diluição da amostra e o antioxidante PG. Como a amostra foi dissolvida em hexano/acetato de etila (1:1, v/v) e, pelo fato de o antioxidante estar em baixíssima concentração, o solvente de diluição da amostra pode agir como eluente diminuindo a retenção do analito na fase estacionária e, conseqüentemente, os valores de recuperação. Fato semelhante foi demonstrado por Delgado-Zamarreño e colaboradores [20] para a retenção do antioxidante DG, cuja polaridade é similar ao PG, em diferentes fases estacionárias. Neste caso, os autores mostraram que, quando a amostra de óleo é percolada diretamente sobre os cartuchos extratores contendo sílica como fase estacionária sendo a eluição realizada com acetonitrila, obtêm-se valores de recuperação próximos de 80%. Contudo, dissolvendo-se a amostra em hexano e realizando a extração com C-18 e, posterior eluição com metanol, a recuperação foi inferior a 10%.

Para os demais antioxidantes, os níveis de concentração não influenciam significativamente nos

valores de recuperação. Destaca-se as amostras enriquecidas com 50, 500 e 1000 mg kg<sup>-1</sup>, as quais apresentaram valores de recuperação entre 84,5% e 99,7% para TBHQ e entre 76,4% e 94,8% para BHA. Nestes casos, há fortes indícios de que houve eliminação dos componentes da amostra o suficiente para permitir quantificar estes antioxidantes com valores de recuperação estatisticamente aceitável. Ademais, os coeficientes de variação foram inferiores a 1,00%, indicando que a precisão do método é satisfatória e que, nestas condições fornece resultados estatisticamente confiáveis.

Na Tabela 5, estão reunidos os resultados obtidos para acompanhar a eficiência do procedimento de extração usando cartuchos de extração contendo CMDB-NVP como fase estacionária. Para obtenção destes resultados, testou-se a eficiência deste material sorvente em extrair os antioxidantes PG, TBHQ e BHA de amostras de biodiesel enriquecidas com níveis de concentrações de 100, 500 e 1000 mg kg<sup>-1</sup>. Neste procedimento (EFS-1) a exatidão e a precisão, avaliadas em termos dos valores de recuperação e do coeficiente de variação, apresentam valores significativos (Tabela 5) e expressam que o procedimento empregando o CMDB-NVP como fase estacionária é altamente efetivo para atender aos objetivos deste trabalho. Para todos os analitos e em todos os intervalos de concentrações estudadas, a recuperação foi superior a 77% e comprova que o procedimento pode ser satisfatoriamente aplicado na extração e posterior determinação dos antioxidantes PG, TBHQ e BHA em amostras de biodieséis.

**Tabela 5.** Resultados obtidos (n = 3) para os ensaios de recuperação do método de extração em fase sólida utilizando a fase estacionária de CMDB-NVP para a quantificação de PG, TBHQ e BHA em amostras de biodiesel.

Antioxidante	C. A. (mg kg <sup>-1</sup> )	C <sub>F</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	C.V. (%)
PG	100	4,00	77,3	0,31
	500	20,0	81,8	0,14
	1000	40,0	88,2	0,13
TBHQ	100	4,00	101	0,51
	500	20,0	100	0,20
	1000	40,0	103	0,11
BHA	100	4,00	99,8	0,06
	500	20,0	104	0,06
	1000	40,0	101	0,09

C.A.: Concentração Adicionada; R.: Recuperação; C.V.: Coeficiente de Variação; C<sub>F</sub>: Concentração esperada se o procedimento recuperasse completamente (100%) a massa de antioxidante adicionada.

### Comparação entre os procedimentos de extração

A partir dos resultados obtidos com os procedimentos de extração líquido-líquido e de extração em fase sólida, observou-se que os valores de recuperação foram, em grande parte, concordantes para a determinação de PG, TBHQ e BHA. Todavia, os dados reunidos na Tabela 6, demonstram que os valores de recuperação com a aplicação da metodologia de extração em fase sólida, utilizando como fase estacionária o CMDB-NVP, foram

superiores aos obtidos com a fase estacionária C-18. Ademais, conforme discutido anteriormente, mesmo com a otimização dos procedimentos de extração em fase sólida contendo as fases estacionárias C-18 e CMDB-NVP, não foi possível extrair o BHT das amostras de biodiesel. Isto foi alcançado, empregando apenas a extração líquido-líquido, entretanto, sua massa não pode ser quantificada devido à coeluição com interferentes provenientes da matriz que comprometeu a identificação e a definição precisa da banda no tempo de retenção do BHT.

**Tabela 6.** Comparação entre as recuperações obtidas (n=3) com os procedimentos de extrações propostos.

Antioxidante	C. A. (mg kg <sup>-1</sup> )	C <sub>F</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)		
			ELL	EFS (C-18)	EFS (CMDB-NVP)
PG	50	2,00	87,4	52,9	N.A.
	100	4,00	N.A.	61,7	77,3
	500	20,0	93,5	86,1	81,8
	1000	40,0	95,9	86,3	88,2
TBHQ	50	2,00	78,3	89,5	N.A.
	100	4,00	N.A.	75,9	101
	500	20,0	82,3	84,5	100
	1000	40,0	86,9	99,7	103
BHA	50	2,00	90,2	81,4	N.A.
	100	4,00	N.A.	77,7	99,8
	500	20,0	92,1	94,8	104
	1000	40,0	94,6	81,5	101

C.A.: Concentração Adicionada; ELL: Extração Líquido-Líquido; EFS (CMDB-NVP): Extração em Fase Sólida com fase estacionária composta por copolímero macroporoso de divinilbenzeno e n-vinilpirrolidona; C<sub>F</sub>: Concentração esperada se o procedimento recuperasse completamente (100%) a massa de antioxidante adicionada.

### Aplicação em amostra comercial

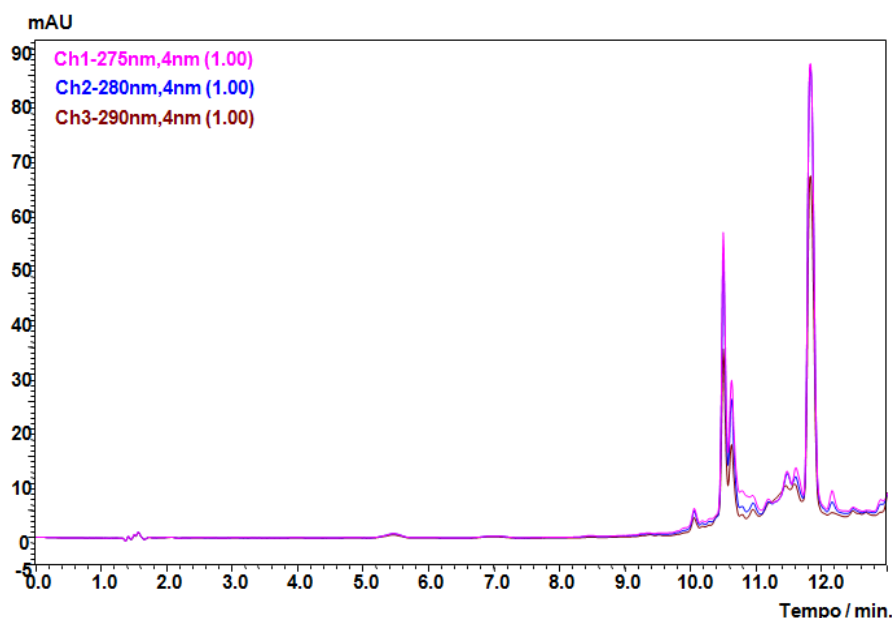
Ressalta-se que não há amostras contendo, simultaneamente, os quatro antioxidantes estudados neste trabalho, entretanto, há possibilidades de encontrar biodiesel contendo uma mistura sinérgica de dois destes antioxidantes. Nas amostras comerciais adquiridas, foi informado pelo fornecedor a presença de 300 mg kg<sup>-1</sup> apenas do TBHQ. Assim, estas amostras foram preparadas conforme os

procedimentos de extração líquido-líquido e em fase sólida (EFS-1 e EFS-2) otimizados neste trabalho e, testou-se a eficiência destes métodos na extração do antioxidante informado. Após a aplicação dos métodos e posterior determinação por CLAE-DAD, não foi detectado a presença deste antioxidante em nenhuma das análises realizadas. A Figura 4 reúne as análises cromatográficas das amostras de biodiesel após a aplicação do procedimento de extração líquido-líquido, os quais confirmam a ausência de uma banda

( $t_R = 4,37$  min.) que ateste a presença deste antioxidante na amostra. Além disso, não observa-se a presença de bandas nos tempos de retenção do PG, BHA e BHT que atestem a presença destes antioxidantes nas amostras comerciais avaliadas.

Considerando que, os procedimentos propostos neste trabalho apresentaram seletividade aceitável,

linearidade adequada no intervalo de aplicação selecionado, bem como valores de exatidão e precisão, os quais atestam serem eficientes para aplicação em amostras comerciais de biodiesel, estes resultados são indicativos de que estas amostras não continham nenhum dos antioxidantes estudados ou se encontravam abaixo do limite de detecção do método.



**Figura 4.1** Cromatogramas obtidos após a aplicação do procedimento de extração líquido-líquido para análise da amostra comercial de biodiesel.

#### 4. CONCLUSÃO

Com a otimização dos procedimentos, envolvendo a comparação das técnicas de extração líquido-líquido e extração em fase sólida (metodologias EFS-1 e EFS-2), foi comprovado que existem muitas dificuldades em extrair, com precisão e exatidão, os antioxidantes PG, TBHQ, BHA e BHT contidos simultaneamente em amostras mais complexas como o biodiesel. Estas dificuldades são ampliadas quando o objetivo é diminuir os custos das análises mediante a redução de solventes orgânicos extratores tóxicos e propor técnicas de extração com consideráveis benefícios ambientais. Contudo, mesmo com as dificuldades em otimizar todas as variáveis para extrair eficientemente os quatro antioxidantes objetivados neste trabalho, as adaptações realizadas nos procedimentos proposto por Peng-Peng e colaboradores bem como nos procedimentos de extração em fase sólida (EFS-1 e EFS-2) possibilitaram a extração, com o máximo de eficiência, dos antioxidantes PG, TBHQ e BHA. Portanto, foram apresentadas neste trabalho várias

propostas, adaptadas de trabalhos anteriores e usadas em amostras alimentícias, de procedimentos de extração, cujas adaptações foram suficientemente úteis para utilização na purificação de antioxidantes presentes em amostras de biodiesel, de forma que a detecção e determinação destes analitos por diferentes técnicas analíticas, em particular a CLAE, pode ser realizada com o mínimo de interferência. Ressalta-se, que o preparo das amostras de biodiesel utilizando os procedimentos supramencionados além de deixar os antioxidantes de interesse em uma condição compatível com o sistema cromatográfico também proporcionou pré-concentrá-los e melhorar o limite de detecção da técnica quando a análise exigiu determinação em amostras diluídas.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agências de fomento CNPq, CAPES, FUNDECT pelo apoio financeiro e à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pelo apoio institucional e financeiro.

## 6. REFERÊNCIAS E NOTAS

- [1] Knothe, G. *Fuel Process. Technol.* **2007**, *88*, 669. [\[CrossRef\]](#)
- [2] Ferrari, R. A.; Oliveira, V. S.; Scabio, A. *Quim. Nova* **2005**, *28*, 19. [\[CrossRef\]](#)
- [3] Lôbo, I. P.; Ferreira, S. L. C.; Cruz, R. S. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1596. [\[CrossRef\]](#)
- [4] BiodieselBR. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/vantagens/vantagens-biodiesel.htm>. Acesso em janeiro de 2011.
- [5] Dwivedi, G.; Jain, S.; Sharma, M. P. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2011**, *15*, 4633. [\[CrossRef\]](#)
- [6] Karavalakis, G.; Hilari, D.; Givalou, L.; Karonis, D.; Stourmas, S. *Energy* **2011**, *36*, 369. [\[CrossRef\]](#)
- [7] Brasil. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 14 jan. 2005. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/Lei/L\\_11097.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L_11097.htm). Acesso em janeiro de 2011.
- [8] Brasil. Resolução ANP nº 4, de 02 de fevereiro de 2010 Diário Oficial da União. Brasília, 3 fev. 2010. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes\\_anp/2010/fevereiro/ranp%204%20-%202010.xml?fn=document-frameset.htm\\$F=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2010/fevereiro/ranp%204%20-%202010.xml?fn=document-frameset.htm$F=templates$3.0). Acesso em maio de 2012.
- [9] Moser, B. R. *Renew. Energ.* **2011**, *36*, 1221. [\[CrossRef\]](#)
- [10] Rafecas, M.; Guardiola, F.; Illera, M.; Codony, R.; Boatella, J.; *J. Chromatogr. A.* **1998**, *822*, 305. [\[CrossRef\]](#)
- [11] Bousseudji, R.; Porthault, M.; Berthod, A. *J. Pharmaceut. Biomed.* **1993**, *11*, 71. [\[CrossRef\]](#)
- [12] Bianchi, L.; Colivicchi, M. A.; Della Corte, L.; Valoti, M.; Sgaragli, P.; Bechi, P. *J. Chromatogr. B.* **1997**, *694*, 359.
- [13] Noguera-Ortí, J. F.; Villanueva-Camañas, R. M.; Ramis-Ramos, G. *Anal. Chim. Acta.* **1999**, *387*, n127. [\[CrossRef\]](#)
- [14] Lanças, F. M.; *Extração em fase Sólida*, Ed. Rima: São Carlos, 2004.
- [15] Razali, I.; Norhaya, H.; Nor Asimah, A. S. *Elaeis* **1997**, *09*, 25.
- [16] Pinho, O.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Oliveira, M. B. P. P.; Ferreira, M. A. *Food Chem.* **2000**, *68*, 353. [\[CrossRef\]](#)
- [17] Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of analysis*. 15th ed. Arlington, VA, p. 1137-1139, 1990.
- [18] Takemoto, E.; Teixeira Filho, J.; Godoy, H. T. *Quim. Nova.* **2009**, *32*, 1189. [\[CrossRef\]](#)
- [19] Perrin, C.; Meyer, L.; *Food Chem.* **2002**, *77*, 93-. [\[CrossRef\]](#)
- [20] Delgado-Zamarreño, M. M.; González-Maza, I.; Sánchez-Pérez, A.; Carabias Martínez, R. *Food Chem.* **2007**, *100*, 1722. [\[CrossRef\]](#)
- [21] Rodil, R.; Quintana, J. B.; Basaglia, G.; Pietrogrande, M. C.; Cela, R. *J. Chromatogr. A.* **2010**, *1217*, 6428. [\[CrossRef\]](#)
- [22] Fries, E.; Püttmann, W. *Water Res.* **2002**, *36*, 2319. [\[CrossRef\]](#)
- [23] Araujo, T. A. Desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para determinação de antioxidantes sintéticos em biodiesel produzido no Estado de Mato Grosso do Sul. [Tese Doutorado] Campo Grande, Brasil; UFG/UFMS/UFU, 2010.
- [24] Hao, P.-P.; Ni, J.-R.; Sun, W.-L.; Huang, W. *Food Chem.* **2007**, *105*, 1732. [\[CrossRef\]](#)
- [25] Tagliabue, S.; Gasparoli, A.; Della Bella, L.; Bondioli, P. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* **2004**, *80*, 37.
- [26] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Diário Oficial da União. Brasília, 02 jun. 2003.
- [27] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). *Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos*. DOQ-CGCRE-008 Revisão 02, 2007. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf). Acesso em abril de 2012.
- [28] Guzman, R.; Tang, H.; Salley, S.; Simon Ng, K. Y. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**, *86*, 459. [\[CrossRef\]](#)
- [29] Araújo, F. D. S.; Moura, C. V. R.; Chaves, M. H. *Quim. Nova.* **2010**, *33*, 1671. [\[CrossRef\]](#)
- [30] Fernandes, D. M.; Serqueira, D. S.; Portela, F. M.; Assunção, R. M. N.; Munoz, R. A. A.; Terrones, M. G. H. *Fuel.* **2012**, *97*, 658. [\[CrossRef\]](#)
- [31] Sin, D. W. M.; Wong, Y. C.; Mak, C. Y.; Sze, S. T.; Yao, W. Y. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 784. [\[CrossRef\]](#)
- [32] Há, N. T. N.; Gopakumar, T. G.; Hietschold, M. *Surf. Sci.* **2013**, *607*, 68. [\[CrossRef\]](#)