

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

**METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE  
ÁCIDOS GRAXOS EM ÓLEO VEGETAL**

**Tese de Doutorado**

**WOLMIR JOSÉ BÖCKEL**

Porto Alegre, 2009

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

**METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE**  
**ÁCIDOS GRAXOS EM ÓLEO VEGETAL**

**WOLMIR JOSÉ BÖCKEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Doutor em Química.

Porto Alegre, novembro de 2009

O trabalho descrito na presente tese, feito inteiramente pelo autor, foi realizado entre junho de 2005 e maio de 2009 no Instituto de Química da UFRGS, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Clárisse Maria Sartori Piatnicki.

*Wolmir José Böckel*

Comissão Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Rosane Barboza Mendonça  
IQ – Universidade Federal de Pelotas - (UFPeI)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Maria Nunes de Azevedo  
IQ – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – (PUCRS)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Schermann Azambuja  
IQ – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – (UFRGS)

Prof. Dr. Dimitrios Samios  
IQ – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – (UFRGS)

Sabedoria.

“Ela é árvore da vida para os que a agarram, e os que a seguram bem devem ser chamados de felizes.” Provérbios 3:18.

## Agradecimentos

À minha querida esposa Daiana A. Böckel pelo apoio e encorajamento, que muito me animou em momentos difíceis e a meus pais pela compreensão.

À Prof<sup>a</sup> Clarisse M. S. Piatnicki pela excelente orientação com ótimas sugestões, apoio e compreensão constantes e pela grande amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Clara I. D. Bica pelo apoio e sugestões na parte de espalhamento de luz que muito contribuiu na minha formação e pela amizade.

À Prof<sup>a</sup> Emilse M. A. Martini pela sua excelente disposição em contribuir para a realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Prof. Dimitrios Samios pelas brilhantes idéias, sugestões que muito contribuiu para a realização deste trabalho e pela amizade.

Às colegas Tanara C. Motta e Kátia Beltri pelo grande auxílio na parte experimental, dedicação e amizade.

À colega Yara P. Da Silva pelo incansável apoio e dedicação na contribuição de idéias e parte técnica durante todos estes anos e pelo companheirismo.

Aos demais colegas do laboratório de eletroquímica: Edilene, Viviane, Sílvia, Patrícia, Rafael, Ariane, Letícia, Fabiana, Kátia Castagno, e todos os que em pouco ou em mais tempo, contribuíram com encorajamento e companheirismo.

À CAPES e CNPq pelas bolsas concedidas, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram na realização e conclusão deste trabalho.

## **Produção científica gerada a partir dos resultados descritos na tese:**

### **Artigos publicados:**

1. C.R.B. Mendonça, Y.P. Silva, W.J. Böckel, E.F. Simo-Alfonso, G. Ramis-Ramos, C.M.S. Piatnicki, C.I.D. Bica, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2009**, 337, 579.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. Influence of the Co-surfactant in the Electrical Conductivity of W/O Microemulsions In: *2006 Joint International Meeting*, 2006, Cancun. , 2006. MENDONÇA, Carla R B, SILVA, Yara P da, BÖCKEL, W. J., BICA, Clara I D, PIATNICKI, Clarisse M. S.
2. Determinação Potenciométrica de Ácidos Graxos em Óleo Vegetal In: *XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica*, 2005, Londrina – Paraná. , 2005. MENDONÇA, Carla R B, SILVA, Yara P da, BÖCKEL, W. J., BICA, Clara I D, PIATNICKI, Clarisse M. S.

### **Trabalhos apresentados em congressos e eventos científicos:**

1. Reatividade do Biodiesel e Suas Misturas em Presença de Aço Carbono 1020 In: *XX Salão de Iniciação Científica XVII Feira de Iniciação Científica III Salão UFRGS Jovem*, 2008, Porto Alegre.  
**XX Salão de Iniciação Científica XVII Feira de Iniciação Científica III Salão UFRGS Jovem.** , 2008. AUZANI, E. S., SILVA, Yara P da, ZMOZINSKI, A. V., BÖCKEL, W. J., PIATNICKI, Clarisse M.S.
2. Estudo da Influência do Co-surfactante na Condutividade Elétrica de Microemulsões In: *XVIII Salão de Iniciação Científica XV Feira de Iniciação Científica I Salão UFRGS Jovem*, 2006, Porto Alegre.  
**Salão de Iniciação Científica - Livro de resumos.** Porto Alegre: UFRGS, 2006. v.1. p.44 - 44 CAMPOS, Tanara M, BÖCKEL, W. J., MENDONÇA, Carla R B, MARTINI, Emilse M. A., PIATNICKI, Clarisse M. S.

3. Formação e Caracterização de Microemulsões de Biodiesel In: *II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel*, 2007, Brasília.

**II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel.** , 2007.

SILVA, Yara P da, BÖCKEL, W. J., MENDONÇA, Carla R B, BICA, Clara I D,  
PIATNICKI, Clarisse M. S.

4. Influência do Co-surfactante na Estrutura de Microemulsões de Água em Óleo de Soja In:  
*XVIII Salão de Iniciação Científica XV Feira de Iniciação Científica I Salão UFRGS Jovem*, 2006, Porto Alegre.

**Salão de Iniciação Científica.** Porto alegre: UFRGS, 2006. v.1. p.34 – 34.

SILVA, Yara P da, BÖCKEL, W. J., MENDONÇA, Carla R B, BICA, Clara I D,  
PIATNICKI, Clarisse M. S.

## ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I: Fundamentos Teóricos.....	4
I.1 Introdução.....	4
I.2 Condutividade Elétrica de Microemulsões.....	6
I.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	7
I.4 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	8
I.5 Voltametria Linear em Ultramicroeletrodo.....	9
I.6 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE).....	10
I.7 Análise por Eletroforese Capilar.....	13
I.7.1 Cromatografia Eletrocínética com Micelas e Microemulsões na Separação de Compostos de Cadeias Longas.....	13
I.7.2 Cromatografia Eletrocínética Capilar em Microemulsões de Água em Óleo.....	17
I.7.3 Eletroforese Capilar em Meio Hidroorgânico.....	18
CAPÍTULO II: Caracterização de Microemulsões.....	20
II.1 Introdução.....	20
II.2 Materiais e Métodos.....	20
II.3 Discussão dos Resultados.....	22
II.3.1 Microemulsões de SDS, Pentanol e Água.....	22
II.3.1.1 Espalhamento de Luz Dinâmico.....	26
II.3.1.2 Voltametria Linear.....	28
II.3.1.3 Coeficiente de Difusão.....	29
II.3.1.4 Raio das Gotículas.....	31
II.3.1.5 Carga Flutuante.....	33
II.3.1.6 Fração Volumétrica das Gotículas.....	35
II.3.1.7 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	38
II.3.2 Caracterização de ME Contendo 20 % de Óleo de Soja.....	42
CAPÍTULO III: Cromatografia Eletrocínética Capilar.....	46
III.1 Introdução.....	46
III.2 Materiais e Métodos.....	47

III.3 Discussão dos Resultados.....	48
III.3.1 Cromatografia Eletrocínética Capilar em Microemulsões de Água em Óleo....	48
III.3.2 Eletroforese Capilar em Meio Hidroorgânico.....	50
III.3.3 Eletroforese Capilar em Meio Não Aquoso.....	55
III.3.4 Determinação do Número de Acidez do Óleo de Soja.....	58
CONCLUSÕES .....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXO.....	64
Produção científica gerada.....	65

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática de microemulsões, água em óleo (a); bicontínua (b) e óleo em água (c). 4
- Figura 2. Geometria de espalhamento em um experimento de espalhamento de luz. O vetor resultante entre  $k_e$  (feixe espalhado) e  $k_t$  (feixe transmitido) é igual ao vetor de espalhamento ( $q$ ). O feixe incidente é representado por  $k_i$ . 8
- Figura 3. Representação de um gráfico de Nyquist de um circuito RC em paralelo e uma resistência difusional  $R_w$  associada.  $R_s$  e  $R_{tc}$  são a resistência ôhmica da solução e a resistência à transferência de carga, respectivamente.  $C_{dl}$  é a capacitância da dupla camada elétrica. 11
- Figura 4. Gráficos de Bode,  $\log |Z|$  versus  $\log f$  (—●—) e  $\log f$  versus ângulo da diferença de fase (—).  $R_p$  é a resistência à polarização e  $C_{dl}$  a capacitância da dupla camada elétrica. 12
- Figura 5. Representação de uma molécula de triacilglicerol. As ramificações de cima para baixo correspondem aos ácidos palmítico, oléico e  $\alpha$ -linolênico, respectivamente. 13
- Figura 6. Representação simplificada dos processos de separação de ácidos graxos livres por cromatografia eletrocínica, a) em meio micelar b) em microemulsão.  $V_{mc}$  e  $V_{me}$  representam a velocidade das micelas e gotículas de microemulsões, respectivamente e  $V_{feo}$ , a velocidade do fluxo eletrosmótico. 15
- Figura 7. Diagrama de fases para o sistema ternário 1-pentanol, SDS e água; —●— reta abrangendo proporção constante de SDS/pentanol de 1:4 e teor de água variável. 23
- Figura 8. Variação do raio geométrico e da condutividade com relação à percentagem de água em misturas de água e 1:4 SDS/1-pentanol a  $25 \pm 1$  °C. 24
- Figura 9. Ajuste sigmoidal da relação entre o raio geométrico e o teor de água para o sistema constituído por 1:4 SDS;1-pentanol e água, a  $25 \pm 1$  °C. 25
- Figura 10. Relação entre a derivada da curva relativa ao raio geométrico versus teor de água para MEs constituídas de SDS/1-pentanol 1:4 e água, a  $25 \pm 1$  °C. 25
- Figura 11. Curvas de correlação das medidas de DLS realizadas em ângulo de  $35^\circ$  para MEs com composições de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 % em água e 1/4 em SDS/pentanol. 27
- Figura 12. Voltamogramas de misturas de 1:4 SDS/pentanol em uma de Pt com  $10 \mu\text{m}$  de diâmetro versus *quasi*-referência de Pt, para diferentes teores de água. 28

Figura 13. Variação de $D$ versus teor de água em ME constituídas de água e 1:4 SDS/pentanol, obtido através da Equação 9	30
Figura 14. Variação de $D_{el}$ versus composição de água em ME constituídas de água e 1:4 SDS/pentanol, obtido através da Equação 10	30
Figura 15. (a) Raio geométrico, (b) Raio das gotículas de microemulsão A/O e c) Raio hidrodinâmico.	32
Figura 16. Variação de $\langle Z^2 \rangle$ versus teor de água na ME calculados a partir de medidas de DLS.	34
Figura 17. Variação de $\langle Z^2 \rangle$ versus composição de água na ME obtido a partir de medidas voltamétricas.	35
Figura 18. Variação da fração volumétrica $\phi$ das gotículas nas MEs versus teor de água.	36
Figura 19. Variação do número de gotículas $\rho$ por unidade de volume com o teor de água em MEs.	36
Figura 20. Diagramas de Nyquist (A) e Bode (B) e (C) de MEs de proporções constantes em SDS/1-pentanol 1:4, variando o teor de água entre 10 e 70%. Microeletrodo de trabalho de Pt com 10 $\mu\text{m}$ de diâmetro.	39
Figura 21. Representação esquemática da célula de três eletrodos de platina com distância variável entre o eletrodo de trabalho (WE) e o eletrodo de referência (RE). CE representa o contra eletrodo.	40
Figura 22. Variação da permissividade do meio com a composições de MEs A/O para diferentes distâncias (d) entre o eletrodos de disco de Pt de trabalho e o de referência, ambos com 2 mm de diâmetro, onde m e R representam a inclinação da reta e coeficiente de correlação, respectivamente.	41
Figura 23. Intensidade vs. $q$ para medidas por SAXS em microemulsões A/O preparadas com diferentes cosurfactantes. Composição das MEs: 8 % $\text{H}_2\text{O}$ , 14,2 % SDS, 20 % OS e 57,8 % de cosurfactante.	42
Figura 24. a) Permissividade relativa do álcool e b) Condutividade elétrica das MEs correspondentes, contendo 8,0 % de $\text{H}_2\text{O}$ , 14,2 % de SDS, 20,0 % de óleo de soja e 57,8 % de cosurfactante.	43
Figura 25. Eletroferograma de óleo de soja refinado aditivado com ácido salicílico (SA), tert-butil-hidroxianisol (BHA) e 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT); eletrólito de corrida constituído por uma solução $4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ KOH em uma mistura de metanol/ propanol (15:85, v/v); e detector UV em 220 nm.	46

Figura 26: Aparelho de EC construído no laboratório, a) controle de temperatura; b) sistema de injeção; c) detector oscilométrico, d) gerador de funções; e) fonte de alta tensão.	47
Figura 27. Eletroferogramas das amostras adicionadas a 1.500 µL de eletrólito de corrida: (a) 40 µL de metanol; (b) 40 µL de solução metanólica de ácido oléico $5,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e 40 µL de solução metanólica de ácido palmítico $4,6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .	49
Figura 28. Eletroferogramas de medidas realizadas nas condições especificadas na Tabela III (a ao f).	53
Figura 29. Eletroferogramas de medidas cujas especificações encontram-se na Tabela IV (1 ao 12).	54
Figura 30. Eletroferograma de uma solução de $5,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido oléico no eletrólito de corrida contendo 50 g L <sup>-1</sup> de amostra de óleo de soja e $13,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido salicílico como padrão interno. Eletrólito de corrida: KOH $4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol/propanol na proporção de 1:6, respectivamente, contendo 10 % de etilenoglicol.	56
Figura 31. Resposta do detector para o padrão de ácido oléico adicionado e padrão interno. A composição é variável para ácido oléico e fixa para o padrão interno ( $13,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ).	57
Figura 32. Sinal de resposta obtido a partir da diferença entre os valores da altura dos picos para cada padrão de ácido oléico adicionado e do padrão interno.	58

## LISTA DE TABELAS

- Tabela I. Composições de MEs correspondentes aos pontos localizados sobre a reta indicada na Figura 7. 23
- Tabela II. Resultados experimentais para MEs contendo 8,0 % H<sub>2</sub>O, 14,2 % SDS, 20,0 % óleo de soja (OS) e 57,8 % de cosurfactante, preparadas com diferentes cosurfactantes na proporção 1:4 SDS:álcool: raio geométrico R, condutividade elétrica  $\kappa$  e viscosidade  $\eta$ . Dados da literatura para os cosurfactantes: viscosidade  $\eta_a$ , solubilidade em água e  $\epsilon$  permissividade relativa. 44
- Tabela III. Condições das medidas realizadas em capilar de 50/150  $\mu\text{m}$ , diâmetros interno e externo, separação em 10 kV, 0,8  $\mu\text{A}$  com detecção catódica e injeção de amostra em 18 cm por 30 s (exceto para a medida “a”). Eletrólito de corrida: 50 % NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup>, 30 % DMF e 20 % butanol. 51
- Tabela IV. Condições das medidas realizadas em capilar 50/150  $\mu\text{m}$  diâmetros interno/externo, separação em 12 kV, 12  $\mu\text{A}$  com detecção catódica e injeção de amostra em 18 cm por 30 s. Eletrólito de corrida: 50 % NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup>, 30 % DMF e 20 % butanol. 52

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- $\phi$  - fração volumétrica das gotículas de ME.
- $\epsilon_r$  - permissividade relativa.
- $\gamma$  - tensão superficial da interface óleo-água.
- $\eta$  - viscosidade do solvente.
- $\kappa$  - condutividade elétrica.
- $\phi$  - deslocamento de fase.
- $\theta$  - ângulo de espalhamento.
- $\lambda$  - comprimento de onda dos raios-X.
- $\mu$  - mobilidade das gotículas.
- $\epsilon$  - permissividade do meio.
- $\eta$  - viscosidade do meio.
- $v$  - velocidade da gotícula.
- $\epsilon_0$  - permissividade do vácuo.
- $\Delta A$  - variação na área da micro emulsificação.
- $\beta$ -CD - beta-ciclodextrina.
- $\Delta G_f$  - energia livre de formação da ME.
- $\Sigma H_{an}$  - totalidade dos ácidos.
- $\Delta S$  - variação na entropia do sistema.
- A - área das placas de um capacitor.
- A/O - microemulsões do tipo água em óleo.
- AGL - ácidos graxos livres.
- AS - ácido salicílico.
- Ben<sup>-</sup> - ânion benzoato.
- BHA - tert-butil-hidroxianisol.
- BHT - 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno.
- Brij - éter dodecil polioxietilenoglicol.
- C\* - teor de água no seio da solução.
- C - capacitância.
- $\langle Z^2 \rangle$  - carga flutuante média.

CE - eletrodo auxiliar.

$d$  - distância entre as placas de um capacitor.

$D$  - coeficiente de difusão translacional das gotículas de microemulsão.

$D_{el}$  - coeficiente de difusão obtido por medidas eletroquímicas.

DLS - espalhamento de luz dinâmico.

DMF - dimetilformamida.

DTAB - dodeciltrimetilamônio.

$e$  - carga elementar eletrônica.

$E$  - campo elétrico aplicado.

$E_{(t)}$  - potencial no tempo  $t$ .

EC - eletroforese capilar.

EIS - espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês electrochemical impedance spectroscopy).

$E_o$  - potencial em uma frequência radial  $\omega$ .

$F$  - constante de Faraday.

FEO - fluxo eletroosmótico.

$i_{lim}$  - corrente limite.

$k_B$  - constante de Boltzmann.

$k_e$  - feixe espalhado.

$k_i$  - feixe de luz incidente.

$k_t$  - feixe transmitido.

LNLS - Laboratório Nacional de Luz Sinchrotron.

ME - Microemulsão.

MEEKC - cromatografia electrocinética capilar em microemulsões.

MEKC - Cromatografia Electrocinética Capilar com Micelas.

O/A - microemulsões do tipo óleo em água.

OS - óleo de soja.

Pt - platina.

$q$  - carga líquida.

$q$  - vetor de espalhamento.

$R$  - raio geométrico.

$r$  - raio iônico.

RE - eletrodo de referência.

$r_{el}$  - raio do eletrodo.

$R_h$  - raio hidrodinâmico.

SAXS - espalhamento de raio-x a baixo ângulo (do inglês small angle x-ray scattering).

SDS - dodecil sulfato de sódio.

$S_I$  - ácido salicílico como padrão interno.

$S_O$  - soluções padrões nas concentrações de ácido oléico.

$T$  - temperatura absoluta.

Ume - ultramicroeletrodo.

UV – região do ultravioleta.

WE - eletrodo de trabalho.

$\rho$  - número de gotículas por unidade de volume.

## RESUMO

A separação cromatográfica de misturas de compostos hidrofóbicos, com cadeias carbônicas longas, apresenta dificuldades como, por exemplo, o entupimento da coluna de separação. Assim, técnicas alternativas de separação e quantificação destes compostos têm sido investigadas.

O aumento da cadeia carbônica diminui drasticamente a solubilidade dos ácidos graxos em meios solventes, porém esta limitação é contornada preparando a amostra de óleo na forma de microemulsão (ME), permitindo o emprego de técnicas eletroanalíticas em razão da elevada condutividade característica desses sistemas.

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação de ácidos graxos livres presentes em óleo de soja diretamente na amostra, sem a necessidade de extração prévia, empregando cromatografia eletrocínética capilar em microemulsões (MEEKC) e eletroforese capilar em solventes orgânicos, ambas com detecção oscilométrica. Foi investigado o comportamento eletroquímico de MEs constituídas de dodecil sulfato de sódio, SDS, pentanol e água, cujo diagrama de fases apresenta uma ampla região de miscibilidade, bem como de microemulsões contendo óleo de soja. Nessa região, para uma faixa de composições correspondendo a diferentes tipos de microemulsões, foram estudadas propriedades como o comportamento das fases e a influência da natureza do co-surfactante e quantificados parâmetros físico-químicos ainda desconhecidos nesses meios, por exemplo, sua condutividade, raio, carga elétrica e coeficiente de difusão das gotículas. Na caracterização das MEs foram empregadas as técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS), voltametria potenciodinâmica, espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e condutometria.

A identificação dos ácidos oléico e palmítico foi realizada em corridas individuais, usando como eletrólito de corrida uma mistura de NaOH, DMF e butanol, com um tempo de análise em torno de 50 minutos, aproximadamente. Já para a ME utilizando como eletrólito de corrida octano, 1-butanol e SDS em tetraborato de sódio aquoso, não houve a separação dos ácidos mencionados. O eletrólito de corrida que melhor atendeu aos requisitos necessários para a determinação da concentração do ácido oléico livre em óleo de soja foi uma mistura contendo  $4 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> de KOH em metanol:propanol na proporção de 1:6, e 10 % em etilenoglicol, com um tempo de análise relativamente pequeno, comparativamente ao sistema hidroorgânico.

## ABSTRACT

The chromatographic separation of hydrophobic compounds from mixtures presents some difficulties such as the occlusion of the column. Therefore, alternative techniques to separate and quantify these compounds have been investigated.

Although the solubility of fatty acids in most solvents falls significantly with increasing carbon chain length this difficulty can be surmounted by preparing the oil sample as a microemulsion (ME) which allows carrying on electroanalytical measurements due to the higher conductivity these systems present as compared to oils and fats.

The aim of this study is to develop analytical methodology in order to quantify free fatty acids in soybean oil, without previous extraction, by microemulsion electrokinetic capillary chromatography (MEEKC) and capillary electrophoresis, both with oscillometric detection. The electrochemical behavior of microemulsions (MEs) prepared with n-pentanol, SDS and water, the phase diagram of which presents a large miscibility region, as well as MEs containing soybean oil, have been investigated. In this region, for composition ranges corresponding to different types of MEs, the behaviour of the phases and the role of the cosurfactant nature have been investigated. Moreover, some physical-chemical parameters, up to now unknown in the studied media, such as conductivity, radii of the particles and their diffusion coefficient were quantified.

Techniques such as dynamic light scattering (DLS) and small angle x-ray scattering (SAXS), linear voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy and conductometry were employed in the characterization of the MEs.

A carrier electrolyte prepared with a mixture of NaOH, DMF and butanol evidenced the presence of either oleic and palmitic acids in individual runs with a time analysis around 50 minutes. For a soybean oil ME using octane, 1-butanol and SDS in aqueous sodium tetraborate as carrier electrolyte there was no separation of the mentioned fatty acids. Finally, the carrier electrolyte prepared with  $4 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> KOH in metanol:propanol 1:6 and, w/w, and 10 % ethilenglycol allowed the determination of the free oleic acid content in a soybean oil sample with a quite short time of analysis as compared to the previous system.

## INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais constituem uma matéria-prima alternativa para a produção de biocombustíveis, seja em substituição ao Diesel ou em “blendas” com este. Presentemente, a produção industrial de biodiesel a partir de óleos vegetais está em expansão no Brasil, o que torna necessário estabelecer parâmetros de qualidade para essas matérias-primas. Entre estes é de interesse o teor de ácidos graxos livres no óleo vegetal como, por exemplo, os ácidos oléico, linoléico, linolênico e palmítico presentes no óleo de soja.

Na análise de amostras oleosas em geral, a questão essencial diante da qual se coloca o analista é saber se os modelos teóricos consagrados da Química Analítica são transponíveis a estes meios, e, se afirmativo, em que condições experimentais, em particular no que se refere aos métodos eletroanalíticos, em geral de menor custo e maior rapidez em razão de sua especificidade.

A proposta deste estudo é desenvolver metodologias de separação, identificação e quantificação de ácidos graxos livres presentes em óleo de soja, diretamente nas amostras de óleo, ou seja, sem a necessidade de extrações prévias.

A separação de misturas de compostos hidrofóbicos com cadeias carbônicas longas por cromatografia em fase gasosa ou líquida apresenta dificuldades como, por exemplo, o entupimento da coluna de separação. Assim, técnicas alternativas de separação e identificação dos mesmos têm sido investigadas, entre elas a eletroforese capilar, objeto do presente trabalho.

Analitos eletricamente neutros, como é o caso de grande parte dos componentes de combustíveis e óleos, não podem ser separados por eletroforese capilar, tornando necessária a utilização de surfactantes em concentração suficientemente elevada para formar micelas. Neste caso, os solutos sofrem um processo de partição entre a fase contínua e as micelas e podem ser separados segundo fatores de retenção.

O modo de operação da eletroforese capilar que emprega micelas é denominado Cromatografia Eletrocínética Capilar com Micelas (MEKC), a qual tem sido aplicada a vários tipos de analitos. A literatura reporta a separação eficiente de compostos hidrofóbicos de cadeias longas, tanto por MEKC (do inglês Micellar Electrokinetic Chromatography) como por MEEKC (do inglês Microemulsion Electrokinetic Chromatography), enfatizando a otimização dos meios de separação, entre os quais se destacam as microemulsões.

Microemulsões (MEs) são sistemas compostos por, no mínimo, três componentes: água, um composto hidrofóbico e um surfactante, sendo necessária, frequentemente, a adição de um cosurfactante, normalmente um álcool de cadeia média. Os sistemas são estáveis, apresentam boas propriedades condutoras e dissolvem simultaneamente substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas.

Com o aumento da cadeia carbônica, a solubilidade no meio solvente bem como a condutividade da solução diminui drasticamente, porém, a preparação da amostra de óleo na forma de microemulsão supera estas limitações ampliando as possibilidades de emprego de técnicas eletroanalíticas.

No primeiro capítulo deste estudo é apresentada, resumidamente, a fundamentação teórica das técnicas de ensaios físicos, físico-químicos e eletroanalíticos empregados para a caracterização dos meios solventes investigados.

O segundo capítulo apresenta os procedimentos de preparação e ensaios de caracterização de microemulsões. Diante da complexidade dos processos envolvidos e dificuldades de interpretação dos resultados, estes estudos foram realizados de modo a aprofundar o conhecimento sobre a estrutura e o comportamento do meio solvente bem como sobre os mecanismos de separação de analitos no mesmo. Neste caso, as amostras foram preparadas na forma de microemulsões de dodecilsulfato de sódio (SDS) pentanol e água e SDS-pentanol-água-óleo de soja, bem como por diluição em meios solventes hidroorgânicos. Em seguida, as MEs foram caracterizadas através da determinação de parâmetros físico-químicos cuja ordem de grandeza era, até então, desconhecida em microemulsões, como, por exemplo, os coeficientes de difusão de espécies moleculares no meio.

Finalmente, o terceiro capítulo apresenta a metodologia desenvolvida para identificar e quantificar os ácidos oléico e palmítico em amostra de óleo de soja. Espera-se, a partir dos resultados alcançados, que a separação de analitos em microemulsões por eletroforese capilar venha, em futuro próximo, a apresentar as características de rapidez, sensibilidade e confiabilidade desejáveis no controle de qualidade de óleos e gorduras.

## **OBJETIVOS**

Este trabalho tem por objetivo desenvolver metodologia analítica para a determinação de ácidos graxos derivados de triacilgliceróis presentes em óleos vegetais, diretamente nas amostras de óleo, ou seja, sem a necessidade de extrações prévias, empregando eletroforese capilar em solventes orgânicos e cromatografia eletrocínética capilar em microemulsões (MEEKC), ambas com detector oscilométrico.

Para avaliar a viabilidade do emprego de microemulsões na determinação de analitos em óleo de soja utilizando cromatografia eletrocínética capilar em microemulsões, torna-se necessária a investigação de seu comportamento eletroquímico num sistema microemulsionado simples constituído de dodecilsulfato de sódio (SDS), pentanol e água empregando espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS), espalhamento de luz dinâmico (DLS), voltametria potenciodinâmica e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

# CAPÍTULO I

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### I.1 Introdução

As microemulsões (ME) são líquidos micro-heterogêneos constituídos de óleo, água e surfactante, frequentemente em combinação com um cosurfactante, que apresentam características tais como transparência óptica, estabilidade termodinâmica e alto poder de solubilização<sup>1</sup>.

O conceito de ME foi introduzido em meados da década de 1940 por Hoar e Schulman<sup>2</sup> os quais obtiveram uma solução transparente por titulação de leite com hexanol. Do ponto de vista micro estrutural, as ME podem ser do tipo água em óleo (A/O), bicontínua ou óleo em água (O/A) (Figura 1). As ME apresentam uma ampla variedade de aplicações, na análise de óleos vegetais<sup>3,4</sup> e nas indústrias farmacêutica<sup>5,6</sup> e de cosméticos<sup>7</sup>.

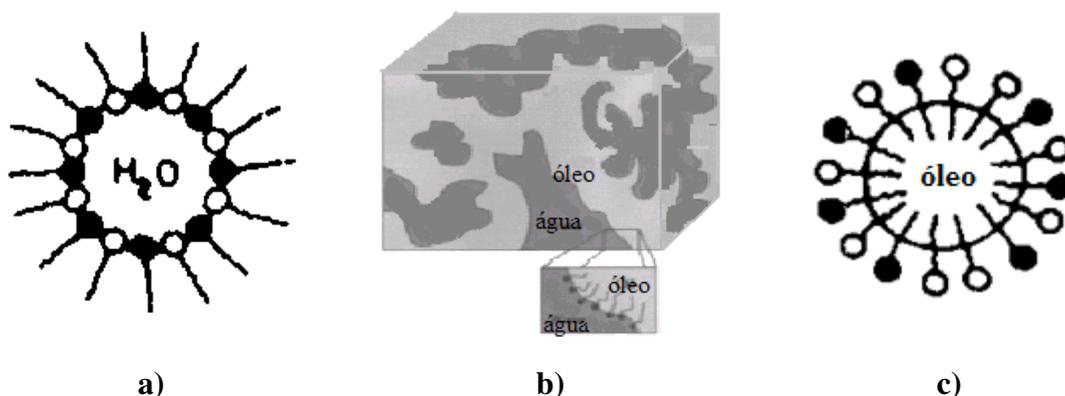


Figura 1. Representação esquemática de microemulsões, água em óleo (a); bicontínua (b) e óleo em água (c).

Na prática, a principal diferença entre emulsões e microemulsões está no fato de que as emulsões exibem excelente estabilidade cinética, instabilidade termodinâmica e tendência à separação das fases<sup>8</sup> enquanto MEs são termodinamicamente estáveis. Outra diferença importante é que as emulsões são opacas enquanto as MEs são transparentes, devido ao tamanho das gotículas, cuja ordem de grandeza é bem menor do que a dos comprimentos de onda da luz visível.

Quanto ao método de preparação, devido à instabilidade termodinâmica que leva à separação de fases, a produção comercial das emulsões envolve um custo relativamente maior em comparação à produção comercial de microemulsões<sup>2</sup>.

Os surfactantes iônicos empregados na preparação de MEs apresentam uma extremidade polar e uma cauda apolar cujo volume é consideravelmente maior. Dispersos em água, os íons do surfactante associam-se mutuamente, formando uma variedade de fases em equilíbrio, cuja natureza depende de interações de forças intra e interiônicas, bem como da variação de entropia. Em solventes não aquosos como os alcanos, por exemplo, os surfactantes também podem se associar. Neste caso, a orientação das moléculas do surfactante ocorre de maneira inversa à que ocorre em solução aquosa. Esta reorientação otimiza a solvatação do surfactante e minimiza a energia livre do sistema. Em uma mistura óleo e água, a localização termodinamicamente favorável das moléculas do surfactante é na interface óleo/água. O número de fases resultante pode se estruturar em escalas macroscópica e microscópica sendo esta última uma solução opticamente isotrópica. Alguns exemplos de fases presentes em microemulsões são: micelas esféricas, cilíndricas, hexagonais e lamelares, denominadas normais (óleo em água) ou reversas (água em óleo). Segundo Lawrence e col<sup>2</sup>, as MEs podem apresentar-se ainda na forma assimétrica adotando, freqüentemente, a forma elipsóide prolato.

A variação da energia livre de formação das MEs depende de quanto o surfactante minimiza a tensão superficial da interface óleo-água. Como a pressão e o volume do sistema mantêm-se constantes, a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) na formação das gotículas é igual à variação da energia da superfície da gotícula ( $\Delta U_{\text{sup}}$ ), que por sua vez está relacionada com a tensão superficial e a área da gotícula. Os autores<sup>2</sup> propõem uma relação termodinâmica simples em que a variação de energia livre é expressa por:

$$\Delta G_f = \gamma dA - T \Delta S \quad (1)$$

onde  $\Delta G_f$  é a energia livre de formação da ME,  $\gamma$  a tensão superficial da interface óleo-água,  $dA$  a variação da área da micro emulsificação,  $\Delta S$  a variação da entropia do sistema ou seja, efetivamente, a entropia de dispersão, e  $T$  a temperatura.

É interessante observar que, devido à maior liberdade de direcionamento da cauda do surfactante, é entropicamente mais favorável acomodar uma molécula de surfactante numa interface de alta curvatura, ou seja, gotículas menores de água em óleo (A/O), onde a cauda

do surfactante fica exposta na fase contínua apolar. Com isto, a tensão interfacial tende a ser menor para MEs A/O do que O/A, facilitando o processo de preparação. Por outro lado, há uma barreira cinética na formação de microemulsões, sendo necessário observar a ordem de adição dos componentes e o uso de agitação ou calor para viabilizar sua preparação. Surfactantes iônicos e não iônicos têm sido empregados na preparação de microemulsões, porém os últimos têm evidenciado uma tensão interfacial significativamente maior.

As transições de sistemas A/O para O/A podem ocorrer de forma gradual em certo número de diferentes estruturas, incluindo bicontínua, lamelar e sistemas multifásicos<sup>2</sup>.

Gradzielski e col<sup>9</sup> realizaram um estudo para a determinação da carga elétrica das gotículas das microemulsões variando a natureza e a concentração do surfactante. Num experimento de espalhamento de luz estático, os autores observaram que, quanto maior a concentração de surfactante iônico, menor a intensidade de espalhamento da radiação eletromagnética. Isto porque a repulsão eletrostática aumenta a organização dos agregados de íons do surfactante na ME resultando em estruturas menores. No entanto, para a concentração máxima possível de surfactante na ME, o fator determinante para a repulsão entre as gotículas é seu volume, num comportamento semelhante ao de esferas densamente empacotadas. Neste caso, a estrutura da gotícula independe de sua carga elétrica, a qual é determinada pela concentração do surfactante iônico.

## **I.2 Condutividade Elétrica de Microemulsões**

O modelo de cargas flutuantes<sup>10</sup> foi proposto para quantificar a condutividade elétrica de soluções neutras diluídas de ME A/O. Gotículas eletricamente carregadas contendo água seriam o resultado de uma flutuação espontânea no número de contra-íons presentes na água os quais, em razão da localização das extremidades carregadas do surfactante na interface água/óleo, ora estão na água, ora ligados ao surfactante. A maior condutividade elétrica de microemulsões tem sido explicada pelo fato de gotículas nanométricas admitirem um excesso de carga, negativa ou positiva, as quais migram sob a ação de um campo elétrico. A magnitude da condutividade deve permanecer constante frente a diluições, porque está diretamente relacionada com o valor médio das cargas no interior da gotícula. Se em cada gotícula houver, aproximadamente,  $10^4$  moléculas de surfactante, poderíamos esperar, a partir do modelo proposto, que cada gotícula suporte em torno de  $10^2$  cargas elementares (a raiz quadrada do número de íons). Porém, um cálculo menos abrangente mostra um valor teórico de condutividade duas vezes maior do que o valor determinado experimentalmente. Portanto,

se essa abordagem físico-química estiver correta, deve haver em contrapartida um mecanismo que reduz drasticamente a carga total das gotículas. Este mecanismo é bem conhecido na teoria de solvatação, na qual, com um argumento eletrostático simples, Born<sup>10,11,12</sup> mostrou que, para carregar um átomo ou uma molécula em um solvente, é necessário uma considerável quantidade de energia de ativação. O modelo foi explorado no estudo de Eicke e col<sup>10</sup> para quantificar a condutividade de microemulsões de água em óleo tendo os resultados obtidos experimentalmente se mostrado consistentes com os valores teóricos.

A condutividade elétrica  $\kappa$ , dada pela Equação 2, é evidenciada pela migração das gotículas, idealmente sem interação umas com as outras, sob a ação de um campo elétrico e é proporcional à fração volumétrica  $\phi$  das gotículas na ME<sup>10</sup>

$$\kappa = \frac{\epsilon_0 \epsilon k_B T \phi}{2\pi\eta r^3} \quad (2)$$

onde  $\epsilon_0$  é a permissividade do vácuo,  $k_B$  a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura absoluta,  $r$  o raio das gotículas,  $\epsilon$  a permissividade relativa do solvente e  $\eta$  sua viscosidade.

### I.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

A ação de um campo elétrico (proveniente da radiação eletromagnética) sobre uma partícula induzirá um momento de dipolo, gerando conseqüentemente um movimento oscilatório, que produzirá luz espalhada em todas as direções (Figura 2). Diversas informações são obtidas da luz espalhada pela amostra, entre elas, a heterogeneidade do sistema, pois, caso contrário, não haverá espalhamento da onda eletromagnética.<sup>13</sup>

Somente após o surgimento de sistemas de detecção do tipo fotomultiplicadores aliados a fontes de laser com alta intensidade, coerência e estabilidade de frequência, tornou-se possível executar medidas relativamente simples sobre a variação dos deslocamentos de frequência da luz espalhada.<sup>14</sup>

No espalhamento de luz dinâmico, DLS (do inglês Dynamic Light Scattering), as flutuações na intensidade da luz espalhada devem-se a variações pontuais do índice de refração da solução, decorrentes dos gradientes locais de concentração da solução que, por sua vez, tem origem na difusão translacional e rotacional das espécies na solução.

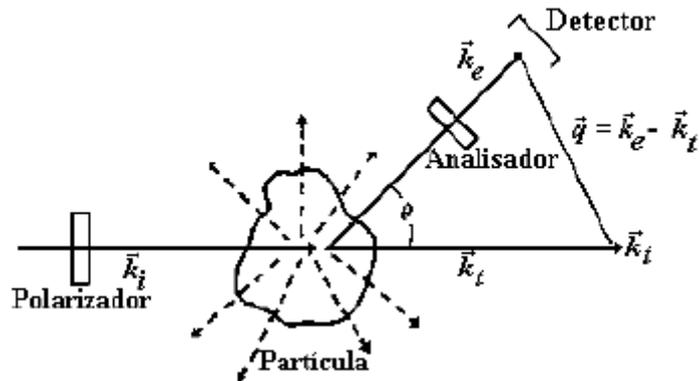


Figura 2. Geometria de espalhamento em um experimento de espalhamento de luz. O vetor resultante entre  $k_e$  (feixe espalhado) e  $k_t$  (feixe transmitido) é igual ao vetor de espalhamento ( $q$ ). O feixe incidente é representado por  $k_i$ <sup>13</sup>.

O número de fótons que chegam ao detector num certo intervalo de tempo é contado repetidamente, por meio de um correlator, e a função de correlação temporal das flutuações de intensidade da luz espalhada é computada. Através desta função, tem-se a correlação dos sinais de intensidade obtidos durante certo tempo, os quais são ordenados de forma periódica<sup>13</sup>.

#### I.4 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

O Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo, SAXS, (do inglês Small Angle X-ray Scattering) permite determinar em MEs, com confiabilidade, o raio de gotículas com magnitude inferior a 3 nm. Isto não é possível através da técnica por espalhamento de luz dinâmico, pois neste caso o limite de incerteza da medida é da mesma ordem de grandeza do raio da gotícula<sup>13</sup>. Supondo que as MEs A/O de óleo de soja, investigadas no presente estudo, sejam sistemas de gotículas monodispersas, a intensidade de espalhamento de raios-X pode ser obtida por contraste da densidade eletrônica e da intensidade relativa de espalhamento,  $I$ , expressa em função do vetor de espalhamento ( $q$ ), como segue:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta \quad (3)$$

onde  $\theta$  é o ângulo de espalhamento e  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios-X. O vetor de espalhamento é obtido de forma semelhante ao do método DLS, conforme ilustrado na Figura 2 no item I.3.

Para o cálculo de  $I$ , a intensidade correspondente ao reservatório da amostra vazio ( $I_V$ ) é subtraída das intensidades da amostra ( $I_A$ ) e do branco ( $I_B$ ), considerando-se ainda a correção de volume. A variação da magnitude das gotículas e o deslocamento do pico máximo da função são evidenciados através do gráfico de  $I$  vs.  $q$ . A dimensão característica das gotículas ( $d$ ), correlacionada com os valores correspondentes ao pico máximo ( $q^*$ ), pode ser obtida através da relação de Bragg<sup>15</sup>:

$$d = \frac{2\pi}{q^*} \quad (4)$$

Finalmente, admitindo-se que na ME A/O as gotículas são esféricas<sup>16</sup>, o raio geométrico característico ( $R$ ) é calculado como sendo a metade do valor de  $d$ .

### **I.5 Voltametria Linear em Ultramicroeletrodo**

A técnica voltamperométrica emprega, em geral, uma célula eletroquímica constituída de 3 eletrodos, ou seja, de trabalho (WE), de referência (RE) e auxiliar (CE). O eletrodo de referência tem seu potencial constante e conhecido, sendo os eletrodos de calomelano saturado e de prata/cloreto de prata os mais freqüentemente utilizados, enquanto o eletrodo auxiliar, normalmente de platina, é quimicamente inerte e com área suficiente para prover o número de elétrons requerido pelos processos de oxidação ou redução<sup>17</sup>.

A técnica baseia-se na variação com o tempo do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho, a uma taxa constante. O valor do potencial é controlado através do eletrodo de referência, registrando-se a corrente que circula entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar<sup>17</sup>. A passagem de corrente elétrica através da célula eletroquímica provoca reações de transferência de carga, que são investigadas através da curva corrente *versus* potencial do eletrodo de trabalho, denominada voltamograma.

O emprego de ultramicroeletrodos apresenta diversas vantagens sobre os eletrodos convencionais, permitindo o estudo de reações eletródicas em meios altamente resistivos<sup>18,19,20</sup> como, por exemplo, os óleos vegetais<sup>21</sup>, onde o valor do potencial de um eletrodo de dimensões convencionais, é afetado por uma queda ôhmica significativa.

O termo ultramicroeletrodo (ume) é empregado para eletrodos com pelo menos uma das dimensões menor do que  $25 \mu\text{m}^{22}$ . Comparados aos eletrodos convencionais (com dimensões milimétricas), os ultramicroeletrodos apresentam vantagens como o rápido estabelecimento do estado estacionário, taxas de transporte de massa elevadas, devido à configuração esférica da camada de difusão, elevada razão sinal/ruído (corrente faradaica/corrente capacitiva), baixa queda ôhmica e valores de corrente extremamente baixos, da ordem de pA a nA<sup>17,19</sup>.

Estas características permitem realizar medidas voltamétricas em solventes orgânicos, na presença de baixas concentrações de eletrólito suporte, ou mesmo na ausência deste<sup>19</sup>. Também em soluções aquosas com baixa força iônica, é possível realizar medidas com alta sensibilidade, sem influência do transporte de massa por convecção, especialmente, quando são empregados eletrodos de dimensões inferiores a  $1 \mu\text{m}^{23}$ .

## I.6 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Em termos gerais, a impedância é a medida da habilidade de um circuito em limitar a passagem da corrente elétrica, quando aplicado um sinal harmônico. Ela confere uma resposta resultante de contribuições capacitivas e indutivas decorrentes da aplicação de um sinal harmônico variável, a qual é adicional à resistência elétrica. O sinal de excitação do circuito é expresso como função temporal,

$$E(t) = E_o \cos(\omega t) \quad (5)$$

onde  $E(t)$  é o potencial no tempo  $t$ , com sua amplitude  $E_o$  em uma frequência radial  $\omega$ . A relação entre a frequência radial e a frequência  $f$  é  $\omega = 2 \pi f$ .

Quando o sistema é linear, a resposta do sinal  $I_t$  estará em fase com o sinal aplicado, mas com diferente amplitude  $I_o$ :

$$I(t) = I_o \cos(\omega t - \phi) \quad (6)$$

onde  $\phi$  é o ângulo de fase.

A impedância pode ser expressa por uma equação análoga à Lei de Ohm como:

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_o \cos(\omega t)}{I_o \cos(\omega t - \phi)} = Z_o \frac{\cos(\omega t)}{\cos(\omega t - \phi)} \quad (7)$$

Na espectroscopia de impedância eletroquímica uma perturbação de potencial é aplicada ao sistema em estudo, e o comportamento do sinal de resposta da corrente pode ser explicado através de um circuito elétrico equivalente, o que possibilita avaliar propriedades físico-químicas, como condutividade do meio e coeficiente de difusão de solutos<sup>24,25</sup>.

A expressão da impedância em função da frequência radial é composta por dois termos, um real e outro imaginário. Um exemplo do gráfico de Nyquist, na Figura 3, é obtido pela relação entre o termo real ( $Z'$ ), representado no eixo das abscissas e o imaginário ( $Z''$ ) no eixo das ordenadas, sendo a impedância representada por um fasor.

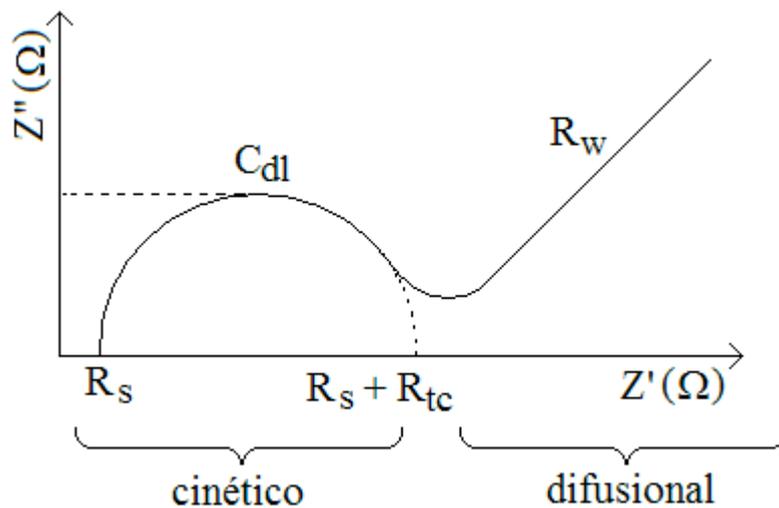


Figura 3. Representação de um gráfico de Nyquist de um circuito RC em paralelo e uma resistência difusional  $R_w$  associada.  $R_s$  e  $R_{tc}$  são a resistência ôhmica da solução e a resistência à transferência de carga, respectivamente.  $C_{dl}$  é a capacitância da dupla camada elétrica.

Através do arco capacitivo obtém-se informações da capacitância da dupla camada elétrica,  $C_{dl}$ , e das resistências ôhmica,  $R_s$  e de transferência de carga,  $R_{tc}$ , na região de controle cinético do sistema. Na região difusional, ou seja, em baixas frequências, quando o processo está sendo governado por difusão, o valor da resistência difusional,  $R_w$ , pode ser obtido quando a inclinação linear for de 45°.

A capacitância da dupla camada elétrica,  $C_{dl}$ , pode ser obtida pelo valor máximo do arco capacitivo. Esta informação está relacionada com a impedância pela expressão:

$$C_{dl} = \frac{1}{2\pi f_m Z''} \quad (8)$$

onde  $f_m$  é o valor da frequência no ponto máximo do arco.

O gráfico de Nyquist apresenta algumas vantagens como:

- a) Vê-se facilmente os efeitos de resistência ôhmica  $R_s$ , ou seja, a forma do semicírculo não varia quando a resistência ôhmica varia. Assim, torna-se possível a comparação de resultados de dois experimentos separados, que diferem somente na posição do eletrodo de referência.
- b) Enfatiza os componentes do circuito que estão em série, como a resistência ôhmica.

Outra forma de representar o comportamento da impedância é através do gráfico de Bode,  $\log |Z|$  versus  $\log f$  ou  $\log f$  versus ângulo da diferença de fase. Normalmente os dois gráficos são plotados juntos, como visto na Figura 4.

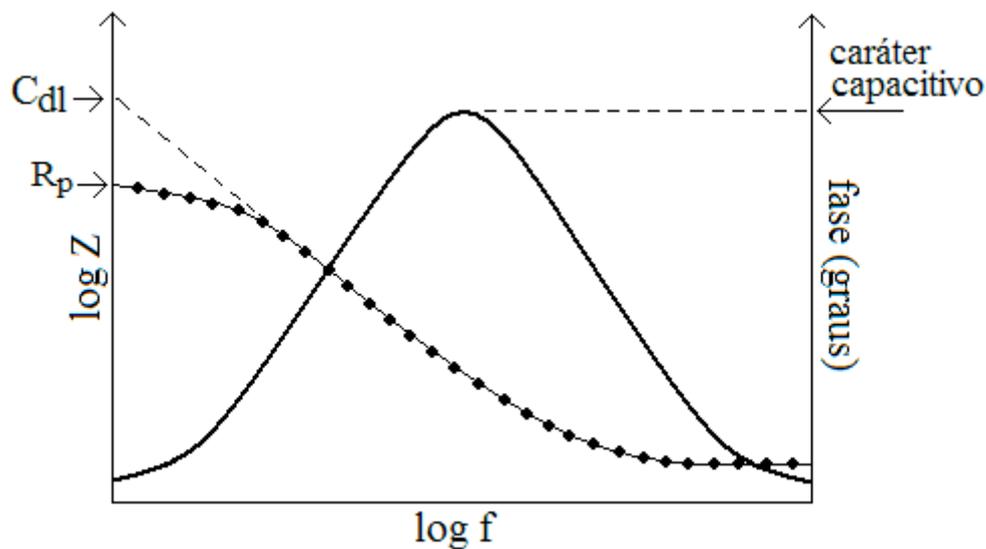


Figura 4. Gráficos de Bode,  $\log |Z|$  versus  $\log f$  (—●—) e  $\log f$  versus ângulo da diferença de fase (—).  $R_p$  é a resistência à polarização e  $C_{dl}$  a capacitância da dupla camada elétrica.

Na representação gráfica  $\log |Z|$  versus  $\log f$  é possível obter o valor da resistência à polarização,  $R_p$ , que é a soma das resistências ôhmica e de transferência de carga, bem como informações da  $C_{dl}$  pela relação na Equação 8 utilizando-se o valor da impedância  $Z$ , quando  $\log f = 0$ , ou seja,  $f = 1$ . Na representação  $\log f$  versus ângulo da diferença de fase é possível obter-se informações sobre o caráter capacitivo do sistema, ou seja, num patamar em ângulo de  $90^\circ$ , o sistema possui um caráter puramente capacitivo, já para valores menores, o comportamento é delineado por contribuições capacitivas e resistivas. Para patamares com ângulo de  $45^\circ$ , o sistema mostra um comportamento predominantemente difusional.

O gráfico de Bode apresenta algumas características como:

- a) A facilidade de observar como a impedância depende da frequência.
- b) A utilização de escala logarítmica permite investigar uma ampla faixa de valores de impedância e de frequência.

## I.7 Análise por Eletroforese Capilar

### I.7.1 Cromatografia Eletrocinética com Micelas e Microemulsões na Separação de Compostos de Cadeias Longas

Os métodos de Eletroforese Capilar (EC) constituem uma ferramenta analítica importante. No entanto, sua aplicação na separação e quantificação de ácidos graxos de cadeias longas ainda está em desenvolvimento, em razão da baixa solubilidade desses compostos em água e em tampões aquosos.

Os triacilgliceróis, glicerídeos formados pela esterificação do glicerol com três ácidos graxos, são os componentes majoritários dos óleos vegetais, como por exemplo, o de soja. (Figura 5).

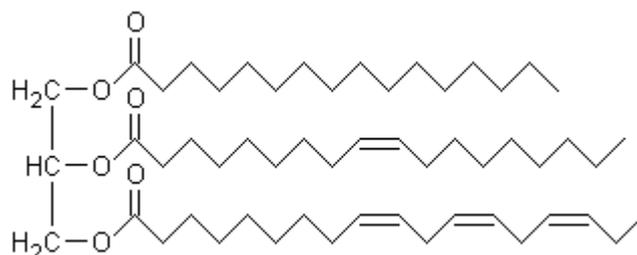


Figura 5. Representação de uma molécula de triacilglicerol. As ramificações de cima para baixo correspondem aos ácidos palmítico, oléico e  $\alpha$ -linolênico, respectivamente.

Os triacilgliceróis presentes no óleo de soja são formados a partir dos ácidos oléico, linoléico, linolênico e palmítico, respectivamente, 21,4; 56,1; 7,2; e 15,3 %, sendo que estes podem ser encontrados livres no óleo<sup>26</sup>. A mobilidade eletroforética de ácidos graxos bem como sua solubilidade decrescem com o aumento da cadeia carbônica linear. Os ácidos graxos com cadeias de 8 a 11 carbonos podem ser separados por eletroforese capilar de zona, diferentemente daqueles contendo entre 11 e 20 carbonos na cadeia, porque nestes a diferença

entre os valores de mobilidade é muito pequena. Por outro lado, em um meio micelar, a solubilidade dos ácidos graxos varia, tornando possível sua separação em uma mistura, de acordo com o comprimento da cadeia carbônica, ou seja, com sua hidrofobicidade<sup>27</sup>.

Para aumentar a seletividade na separação de ácidos graxos de misturas, a literatura reporta o emprego intensivo de ciclodextrinas. Neste caso, as constantes de formação dos complexos envolvidos dependem tanto do comprimento da cadeia alquila, como do número e posição das ligações duplas carbono-carbono. Mesmo assim, a solubilidade é limitada aos ácidos graxos livres com aproximadamente 18 átomos de carbono, que corresponde, em uma configuração de estiramento, a um comprimento de cadeia da ordem de 3 nm, enquanto a profundidade da cavidade hidrofóbica de uma ciclodextrina é próxima de 0,8 nm. Portanto, deste ponto de vista, os ácidos graxos mais pesados são mais facilmente solubilizados por um sistema micelar do que por ciclodextrinas<sup>28</sup>.

Erim e col<sup>27</sup> analisaram quantitativamente amostras de manteigas e gorduras vegetais saponificadas empregando MEKC com detecção indireta por UV. No entanto, o procedimento não evidenciou a resolução de ácidos graxos livres, resultando em uma sobreposição de picos relativos a ácidos graxos saturados e insaturados.

A separação de analitos neutros na presença de micelas aniônicas, técnica utilizada inicialmente por Terabe e col<sup>29</sup> em 1984, é a forma usual de MEKC, na qual a injeção da amostra é feita na extremidade anódica do capilar e a detecção, na extremidade catódica. Neste caso, o processo de partição dos analitos ocorre entre as micelas e o eletrólito de corrida na fase contínua, sendo a magnitude do fluxo eletrosmótico no sentido do cátodo superior à velocidade das micelas no sentido do ânodo.

A MEEKC é uma variação da MEKC em que a partição dos analitos ocorre entre um eletrólito de corrida em fase contínua e as gotículas móveis de óleo presentes num eletrólito de corrida microemulsionado. A Figura 6 a) e b) representa através de um diagrama a separação nestes dois meios.

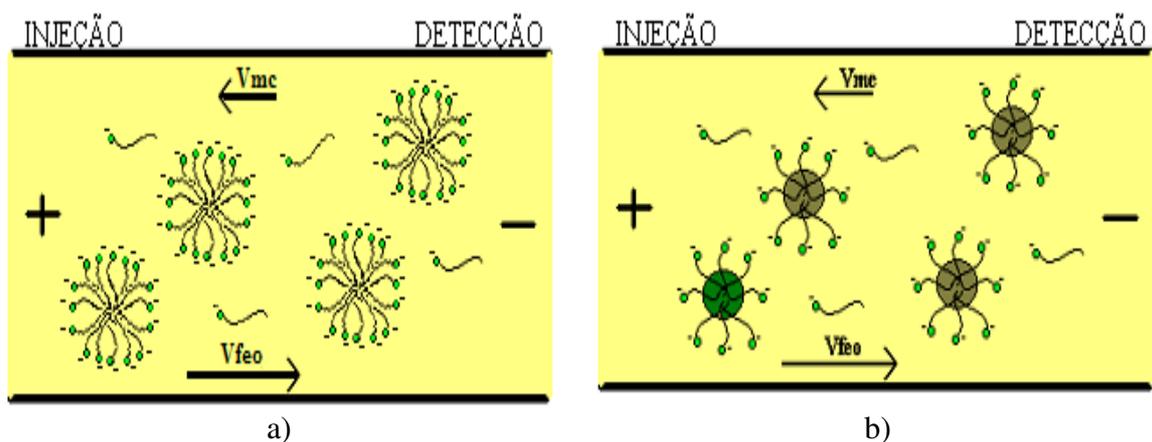


Figura 6. Representação simplificada dos processos de separação de ácidos graxos livres por cromatografia eletrocinética, a) em meio micelar b) em microemulsão.  $V_{mc}$  e  $V_{me}$  representam a velocidade das micelas e gotículas de microemulsões, respectivamente e  $V_{feo}$ , a velocidade do fluxo eletrosmótico.

A separação por MEKC de analitos neutros na presença de micelas aniônicas e de analitos aniônicos na presença de micelas neutras foi investigada por Collet e col<sup>28</sup> em uma mistura de ácidos graxos livres (AGL) saturados e insaturados. Segundo o autor, os ácidos graxos se distribuem entre a micela e a fase contínua do eletrólito de corrida. Portanto, sendo o interior das micelas hidrofóbico, a quantidade de AGL na fase micelar aumenta com o aumento da cadeia alquila, resultando num maior tempo de permanência na micela. Conseqüentemente, devido à diminuição da mobilidade eletroforética, micelas de AGL de cadeias maiores terão um tempo de migração maior, o que por sua vez diminui o tempo de retenção: ou seja, elas serão mais facilmente arrastadas pelo fluxo eletrosmótico (FEO).

A adição de um surfactante neutro como, por exemplo, éter dodecil polioxietilenoglicol (Brij), a um sistema contendo um surfactante aniônico, forma uma micela mista, com a conseqüente diminuição da densidade de carga. Com isto, o tempo de migração torna-se ainda menor do que no caso acima descrito, devido ao aumento da mobilidade eletroforética da micela (arraste pelo FEO). Porém, neste caso, poderá haver uma diminuição da janela de separação, afetando a resolução dos picos do eletroferograma<sup>28</sup>.

A cromatografia eletrocinética em sistemas de microemulsões (MEEKC) é uma metodologia analítica relativamente recente e foi introduzida por Watarai em 1991 para a separação de compostos aromáticos fluorescentes<sup>30</sup>. Terabe e col<sup>31</sup> usaram-na para separar misturas de compostos aromáticos e fármacos empregando dodecilsulfato de sódio, comparando os resultados com aqueles obtidos por MEKC. Outros autores empregaram

eletroforese capilar em microemulsão na separação de compostos, como por exemplo: graxas e vitaminas solúveis em água, esteróides, analgésicos e antipiréticos, difenilhidrazonas e açúcares dicarbonílicos e glicosídeos cardíacos<sup>32</sup>. As microemulsões óleo em água, de acordo com Terabe e col<sup>31</sup>, consistem num cerne de solvente orgânico envolto pelo surfactante e cosurfactante, cuja função é estabilizar a gotícula. Assim, aparentemente, a estrutura da microemulsão é semelhante à da micela, ou seja, o surfactante e o cosurfactante estão localizados na superfície da gotícula de óleo.

Eletrólitos de corrida com pH elevado, como soluções aquosas de borato e fosfato, são geralmente utilizados em MEEKC por gerar um fluxo eletroosmótico significativo. Devido ao recobrimento com SDS, a gotícula de óleo está carregada negativamente e o sentido de sua migração tende a opor-se ao do fluxo eletroosmótico (Figura 6b).

O tempo de migração de um soluto neutro em separação por MEEKC é diretamente proporcional a sua hidrofobicidade ( $\log P$ )<sup>33</sup>. Assim, a partição de solutos hidrofóbicos se dá preferencialmente na gotícula oleosa onde eles são mais retidos do que solutos hidrofílicos. Estes, por sua vez, possuem uma tendência muito pequena à partição na gotícula de óleo.

Da mesma forma que em MEKC, um efeito similar tem sido observado em MEEKC. Ao se injetar a amostra oleosa no capilar, a presença do solvente orgânico no qual ela está dissolvida deforma a estrutura do meio microemulsionado adjacente à zona da amostra.<sup>33</sup> O uso de tempos de injeção menores do que 3 s a 0,1 p.s.i. (1 p.s.i.=6894.76 Pa) em MEEKC, permite uma melhor detecção para amostras contendo altos teores de solventes orgânicos enquanto tempos de injeções maiores, bem como altas pressões, resultam em maiores tempos de análise e baixa resolução.<sup>34</sup>

Em relação à MEKC, vários fatores evidenciam vantagens da técnica por MEEKC, tida como uma opção extremamente útil em análises farmacêuticas.<sup>34</sup>

A seletividade de separação em MEEKC foi comparada com MEKC por Boso e col,<sup>1</sup> empregando três misturas padrão. Na separação por MEEKC observou-se uma melhor afinidade de compostos apolares com as gotículas do que com micelas de SDS, bem como um aumento da janela do tempo de migração e melhor eficiência de separação.

A vantagem da utilização de um sistema microemulsionado na separação de ésteres fenacílicos, comparativamente aos resultados obtidos por MEKC foi evidenciada por Miksýk e col.<sup>30</sup> O uso de microemulsão como pseudofase em conjunto com um reagente de derivatização mais hidrofóbico resultou em melhor seletividade e eficiência de separação. Neste caso, o estudo da influência do solvente orgânico e do surfactante indicou ser vantajosa a substituição do octanol por heptano e do SDS por colato. Assim, enquanto o sistema micelar

contendo colato permitiu a separação de ácidos graxos até  $C_{12}$ , o sistema microemulsionado apresentou uma separação praticamente completa de todos os componentes da mistura teste contendo compostos de  $C_2$  até  $C_{20}$ .

### **I.7.2 Cromatografia Eletrocínética Capilar em Microemulsões de Água em Óleo**

Recentemente, a separação de espécies hidrofóbicas em meio microemulsionado A/O e fase contínua constituída de alcanos de cadeias longas ou álcoois pouco solúveis em água, como por exemplo, pentanol e butanol, tem se mostrado eficaz.<sup>35</sup> Estas microemulsões contêm água, surfactante e possivelmente um cosurfactante ou uma fase oleosa adicional. A fase oleosa adicional (localizada no exterior da gotícula de água, envolta pelo surfactante) diminui a tensão superficial das gotículas aumentando sua estabilidade. A capacidade de solubilização do cosurfactante em água depende da proporção surfactante/cosurfactante. Se a concentração de cosurfactante é muito elevada ocorrerá uma separação em duas fases, enquanto um excesso de surfactante causará a formação de uma fase líquida cristalina.

A vantagem no emprego de microemulsões A/O é a dissolução de analitos insolúveis em água, em razão da alta concentração de óleo na ME, porém o grau de separação dos analitos no meio não está diretamente relacionado com sua hidrofobicidade. Isto porque, em razão da diversidade dos processos de partição e dissociação, a seletividade para cada analito é diferente daquela obtida pelo método convencional de MEEKC.

A hidrofobicidade dos analitos é um importante parâmetro físico-químico para os métodos de eletroforese capilar em microemulsões (MEEKC), tanto A/O como O/A sendo esperado que compostos hidrofílicos sejam mais retidos em MEEKC A/O devido a sua maior solubilização pela água no interior das gotículas. Essa metodologia oferece vantagens na redução do tempo de preparo da amostra e na diversidade de solventes orgânicos disponíveis para a solubilização de compostos insolúveis em água.<sup>35</sup>

O uso de butanol e pentanol como cosurfactantes, bem como de heptano e octano como óleos foi investigado por Broderick e col.<sup>36</sup> As MEs contendo butanol apresentaram melhor separação dos analitos quando comparadas àquelas contendo pentanol. A viscosidade do butanol é menor do que a do pentanol e, em consequência, sua condutividade é significativamente maior. Em relação à natureza do óleo, os picos dos analitos testados praticamente ficaram sobrepostos no sistema pentanol/octano enquanto para pentanol/heptano a separação e resolução foram evidenciadas. Já num sistema butanol/octano a troca do octano por heptano como fase oleosa adicional, reduziu bruscamente a seletividade e diminuiu

levemente o tempo de migração. Segundo os autores, a soma dos comprimentos das cadeias carbônicas de ambos, heptano e pentanol (ou mistura butanol/octano), é igual ao comprimento da molécula do surfactante SDS, que contém 12 carbonos. Portanto, dependendo do comprimento da cadeia carbônica dos componentes oleosos, a adição de uma fase oleosa adicional à ME torna-a mais estável, favorecendo a seletividade e uma melhor separação dos componentes da mistura.

### **I.7.3 Eletroforese Capilar em Meio Hidroorgânico**

A visão mais simples da solvatação de um soluto ionóforo ou ionogênio consiste no processo de quebra das ligações entre os átomos das moléculas por interações com as moléculas do solvente de modo a promover a dispersão dos íons no meio de forma homogênea. Para que a dissolução ocorra é preciso que as forças das ligações químicas no soluto sejam sobrepujadas por forças de interação soluto-solvente, expressas pela energia de solvatação da substâncias dissolvidas. Em geral, os parâmetros que mais influem na magnitude das interações solvente-soluto são a permissividade relativa, momento dipolar, momento quadrupolar, polarizabilidade e estrutura do solvente.

Em termos gerais, as substâncias iônicas são mais solúveis em meios com permissividade relativa mais elevada, momento dipolar elevado, formação de ligações hidrogênio com o solvente e capacidade de coordenação. Já substâncias apolares são mais solúveis em solventes de alta polarizabilidade.<sup>37</sup>

Por outro lado, a solvatação de moléculas neutras e apolares deve-se à formação de cavidades no solvente ou mistura de solventes, suficientemente grandes para acomodar a molécula do soluto e alguma outra molécula de solvente associada ao mesmo. Não havendo reação química, a molécula será estabilizada na cavidade por forças de London ou de dispersão, relacionadas com a polarizabilidade do solvente. No caso de solventes altamente estruturados como a água, as moléculas neutras e apolares não se dissolvem em razão da elevada energia necessária para a quebra das ligações entre as moléculas de soluto. Uma explicação mais detalhada desta inviabilidade está no fato das moléculas de água formarem um encapsulamento em torno das moléculas do soluto o que diminui a entropia da solução e aumenta a energia livre de solvatação.<sup>38</sup>

A mistura de solventes leva a interações solvente-soluto bastante complexas. A adição de solutos não polares a uma mistura de água e uma pequena quantidade de solvente (abaixo

de 10% em peso) como, por exemplo, álcool, acetona, dioxano ou tetrahidrofurano, reforça a estrutura da água. Neste caso são observados os valores máximos de propriedades como viscosidade, produto de Walden e entalpias de solução. Presumivelmente, para teores mais elevados do solvente não aquoso ocorre uma maior desorganização da estrutura da água, como evidenciado para o caso de etanol em água pela formação de fortes ligações água-álcool. Em suma, o papel do solvente deve ser avaliado considerando parâmetros macroscópicos como permissividade relativa e constantes de equilíbrio e propriedades microscópicas das moléculas do solvente individualmente como momento de dipolo, momento de quadrupolo, polarizabilidade, ligações de hidrogênio, capacidade de coordenação e estrutura das moléculas.

Em eletroforese capilar, além de solubilizar os analitos investigados, a seleção do solvente orgânico ou mistura de solventes deve obedecer alguns requisitos,<sup>39</sup> tais como:

- ponto de ebulição e de fusão moderados;
- permissividade relativa preferivelmente maior do que 30;
- baixa viscosidade, para promover o aumento da mobilidade iônica, melhorar o preenchimento do capilar pela solução e evitar a formação de bolhas;
- condutividade térmica elevada, para minimizar o efeito Joule;
- menores tempos de separação dos componentes da mistura.

Os solventes apróticos, por não apresentarem ligações de hidrogênio, não estabilizam os ânions e, geralmente, elevam significativamente o pKa de ácidos neutros.

A partir dos dados da literatura discutidos até aqui, várias composições de eletrólitos de corrida e de condições de preparação de amostras e padrões foram investigados, por diversas técnicas, como descrito a seguir.

## **CAPÍTULO II**

### **CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES**

#### **II.1 Introdução**

O desenvolvimento de metodologias de análise direta, rápidas, reprodutíveis e econômicas para a separação, identificação e quantificação de espécies químicas em óleos vegetais constitui alvo de grande interesse. Neste sentido, o emprego do óleo na forma de microemulsão permite usar métodos analíticos que não são aplicáveis diretamente no óleo, particularmente os eletroanalíticos. Para isto, é necessário aprofundar o conhecimento sobre estes meios.

O preparo das amostras de óleo sob a forma de microemulsões de água em óleo, bem como a utilização de meios não aquosos permite eliminar dos procedimentos analíticos as etapas de extração diminuindo a probabilidade de erros aleatório e sistemático.

#### **II.2 Materiais e Métodos**

Dodecil sulfato de sódio (SDS) 99 % (ACROS, New Jersey, USA) foi o surfactante empregado nas microemulsões. Para o sistema ternário, o cosurfactante utilizado foi 1-pentanol de pureza 99 % (ACROS, New Jersey, USA) e água destilada e deionizada.

Para o estudo da influência da natureza do cosurfactante nas propriedades das MEs foram utilizados 1-pentanol, 3-metil-1-butanol, ciclohexanol, 1-octanol, etilenoglicol, com pureza entre 99-99,5 % de (Merck, Darmstadt, Alemanha); 1-hexanol 96 % (Riedel, Hannover, Alemanha); 2-propanol 99,5 % (Nuclear, São Paulo, Brasil); 2-pentanol, 1-heptanol, entre 97-98 % de pureza (Acrós, New Jersey, EUA). Todos os reagentes empregados neste estudo são de grau analítico e todas as soluções, salvo especificação, foram preparadas em proporções mássicas

- Construção do diagrama de fases:

Na construção do diagrama de fases buscaram-se economia de reagentes, rapidez na preparação e redução da quantidade de utensílios volumétricos como copos, pipetas, etc. Para tanto, a construção do diagrama foi iniciada com uma solução de pequeno volume nas proporções de SDS/pentanol e água numa extremidade da região de limite de miscibilidade. Com o auxílio de uma balança analítica de marca Sartorius e um agitador magnético de marca Metrohm, monitorou-se visualmente a miscibilidade das soluções com a adição de proporções previamente calculadas de cada componente do diagrama, registrando-se cada ponto num diagrama de fases.

- Preparação de misturas contendo SDS e pentanol na razão ponderal 1:4 e água, em diferentes proporções:

Inicialmente preparou-se uma quantidade maior de solução de SDS/pentanol 1:4 com 10 % em água com auxílio de agitação magnética e temperatura ambiente. Na sequência, retiraram-se alíquotas desta solução às quais foram adicionadas porções de água a fim de atingir as percentagens de 20, 30, 40, 50, 60 e 70 % em água, correspondentes a composições definidas por uma reta traçada sobre o diagrama (ver Figura 7). Este procedimento foi escolhido a fim de minimizar erros de preparação e manter a proporção constante em SDS/pentanol.

- Condutividade elétrica das MEs:

As medidas foram realizadas em um condutímetro da Metrohm, modelo 712 o qual foi aferido com uma solução de KCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> de condutividade 1,413 mS a 25 °C.

- Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS):

O raio geométrico das gotículas de água nas microemulsões com diferentes composições foi determinado por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas-SP, utilizando a linha de luz síncrotron D11A-SAXS1 com  $\lambda=1,608 \text{ \AA}$  e uma fenda de 732,5 mm. (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas-SP).

- Medidas de voltametria linear:

Utilizou-se uma célula eletroquímica com 3 eletrodos de Pt, um de *quasi*-referência, um auxiliar e um ultramicroeletrodo (ume) de disco com 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro como eletrodo de trabalho, a uma velocidade de varredura de potencial de 1 mV s<sup>-1</sup>. O pré-tratamento do ume foi realizado com imersão em solução de ácido sulfúrico/nítrico na proporção 1:1 por 10 minutos com ultrassom seguida de lavagem com água deionizada e secagem com ventilação forçada.

- Espectroscopia de Impedância Eletroquímica:

O primeiro experimento foi realizado com uma célula eletroquímica com 3 eletrodos de Pt, um de *quasi*-referência, um auxiliar e um ultramicroeletrodo (ume) de disco com 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro como eletrodo de trabalho. No estudo da permissividade do meio, as medidas foram realizadas empregando uma célula construída em laboratório constituída de três eletrodos de platina, a saber, os eletrodos de trabalho e *quasi*-referência, respectivamente, com 2 mm de diâmetro cada um e um contra eletrodo. O potencial utilizado foi de 0,000 V, a fim de evitar a ocorrência de alguma reação química. A faixa de frequência foi de 100 kHz a 10 mHz numa amplitude de 10 mV. Os resultados foram obtidos utilizando um potenciostato PGSTAT30 da Autolab.

As propriedades físico-químicas de microemulsões contendo 14,2 % de uma pseudo-fase SDS/álcool na razão mássica de 1:4, 8 % de água, 20 % de óleo de soja e 57,8 % de diferentes álcoois foram avaliadas com relação à natureza do cosurfactante. Todas as MEs foram agitadas por 10 minutos antes dos experimentos.

## **II.3 Discussão dos Resultados**

### **II.3.1 Microemulsões de SDS, Pentanol e Água**

Foi construído um diagrama de fases ternário, de modo a definir a região de composições estáveis para cada sistema estudado. Para o estudo dos parâmetros físico-químicos do meio solvente, como condutividade elétrica, raio geométrico, carga e coeficiente de difusão das gotículas de MEs em um sistema ternário simples contendo SDS e pentanol na razão ponderal 1:4 e água, em diferentes proporções.

O diagrama de fases para o sistema SDS, pentanol e água mostrou a formação de MEs em uma ampla região, sendo selecionadas composições de MEs correspondentes aos pontos localizados sobre a reta indicada na Figura 7.

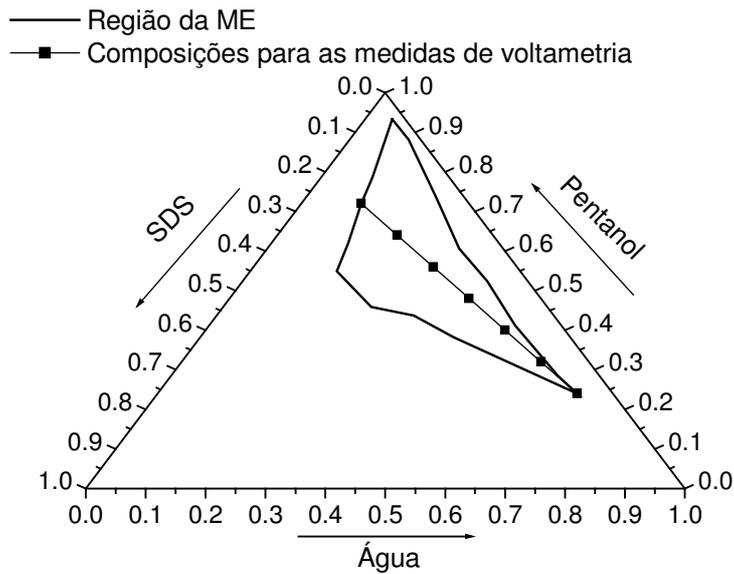


Figura 7. Diagrama de fases para o sistema ternário 1-pentanol, SDS e água; —●— reta abrangendo proporção constante de SDS/pentanol de 1:4 e teor de água variável.

Para estas composições, correspondentes aos pontos sobre a reta, como mostra a Tabela I, a proporção em SDS e pentanol é constante (1:4) enquanto o teor de água varia de 10 a 70 %, entre os limites de miscibilidade dos componentes SDS, pentanol e água. Para determinar as dimensões e a carga das gotículas foram realizadas medidas por DLS, SAXS e voltametria linear.

Tabela I. Composições de MEs correspondentes aos pontos localizados sobre a reta indicada na Figura 7.

Água na ME %	Fração mássica		
	Água	SDS	Pentanol
10	0,0678	0,1799	0,7522
20	0,1761	0,1648	0,6591
30	0,2815	0,1437	0,5748
40	0,3862	0,1227	0,5089
50	0,4902	0,1019	0,4079
60	0,5935	0,0813	0,3252
70	0,6961	0,0607	0,2432

A Figura 8 mostra a variação do raio geométrico, obtido por medidas de SAXS, e da condutividade elétrica das gotículas de MEs do sistema contendo SDS:1-pentanol na proporção de 1:4 em função do teor de água na ME. Observa-se uma tendência de correlação no comportamento entre o raio da gotícula e a condutividade, porém o aumento destes parâmetros apresenta taxas de crescimento diferentes. Na região entre 10 e 30 % em água, aproximadamente, verifica-se um pequeno aumento nos valores do raio geométrico das microemulsões. Este comportamento, frente à maior inclinação dos valores de condutividade, pode ser atribuído a um aumento do número de gotículas nas microemulsões com a adição de água. Observa-se uma tendência semelhante a partir da ME a partir da região bicontínua. Entre 30 e 50 % de água, aproximadamente, os valores de condutividade tendem a seguir a mesma inclinação da curva correspondente ao raio geométrico. Como a condutividade é inversamente proporcional ao raio (Equação 2), este comportamento pode estar sendo governado essencialmente pelo aumento da permissividade relativa do meio, a qual é modificada gradualmente pela adição de água.

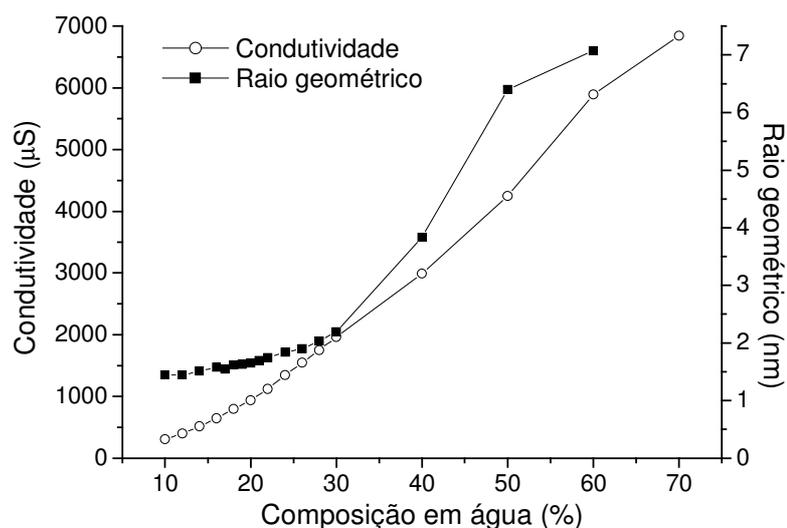


Figura 8. Variação do raio geométrico e da condutividade com relação à percentagem de água em misturas de água e 1:4 SDS/1-pentanol a  $25 \pm 1$  °C.

A Figura 9 mostra a curva resultante do ajuste sigmoidal para os valores do raio geométrico obtidos a partir dos dados da Figura 8, a qual apresenta na Figura 10 um ponto de inflexão no gráfico da derivada destes valores, que é atribuído à região de inversão da microemulsão de A/O para O/A, em concordância com o aumento do teor de água.

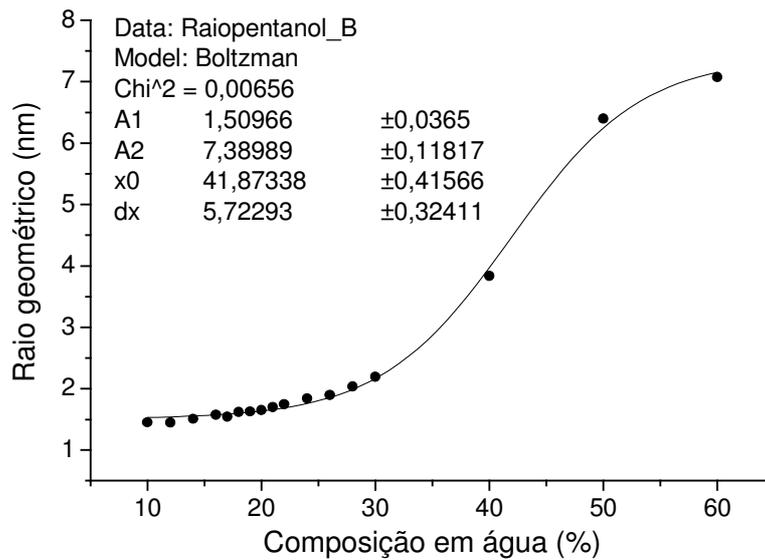


Figura 9. Ajuste sigmoidal da relação entre o raio geométrico e o teor de água para o sistema constituído por 1:4 SDS;1-pentanol e água, a  $25 \pm 1$  °C.

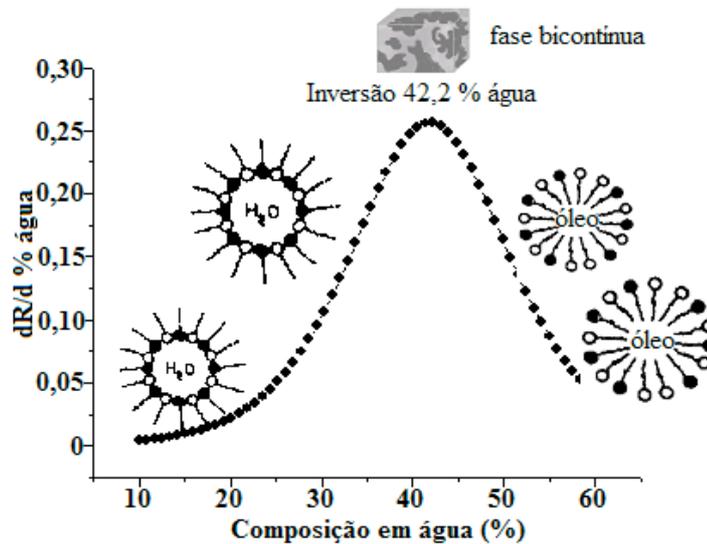


Figura 10. Relação entre a derivada da curva relativa ao raio geométrico *versus* teor de água para MEs constituídas de SDS/1-pentanol 1:4 e água, a  $25 \pm 1$  °C.

Portanto, na determinação do ponto de inversão, utilizando-se a derivada dos valores do ajuste sigmoidal, conforme Figura 10, os valores do raio geométrico e de condutividade são coerentes ao indicar para este ponto teores de água de 42,2 % e de 47,6 %, respectivamente, ou seja, uma diferença de apenas 5,4 %, particularmente considerando que

estes valores foram obtidos por métodos diferentes e a partir de um pequeno número de ensaios. Por outro lado, o ponto central da reta traçada no domínio de MEs da Figura 7 confirma esta mesma ordem de grandeza para o teor de água.

### **II.3.1.1 Espalhamento de Luz Dinâmico**

O tratamento dos dados de DLS obtidos para as MEs nas composições representadas por pontos sobre a reta da Figura 7 foi realizado pelo programa REPES cuja curva de correlação apresentou picos de diferentes valores de difusão, com maior incidência nas regiões de limite de miscibilidade (10 e 70 % em água), conforme mostra a Figura 11. Esta dispersão de valores de difusão pode estar relacionada com a baixa estabilidade termodinâmica, uma vez que estas composições estão situadas na região de fronteira da miscibilidade, como visto no diagrama de fases na Figura 7, no item II.3.1.

Como a concentração do surfactante SDS está acima da concentração crítica micelar<sup>40</sup> que se situa em  $8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , verifica-se que os picos intermediários podem estar representando simplesmente micelas de SDS, os picos maiores indicam vesículas de SDS, pentanol e água e os picos menores podem ser considerados artefatos.

Conforme visualizado na Figura 11, as composições de 10 a 40 % representam um sistema A/O e de 60 a 70 % o sistema passa a ser O/A. Para a composição contendo 50 % em água, o pico único, maior do que os das demais composições é característico de fase bicontínua.

Os valores do raio hidrodinâmico para cada composição, obtidos por DLS, são discutidos no item II.3.1.4.

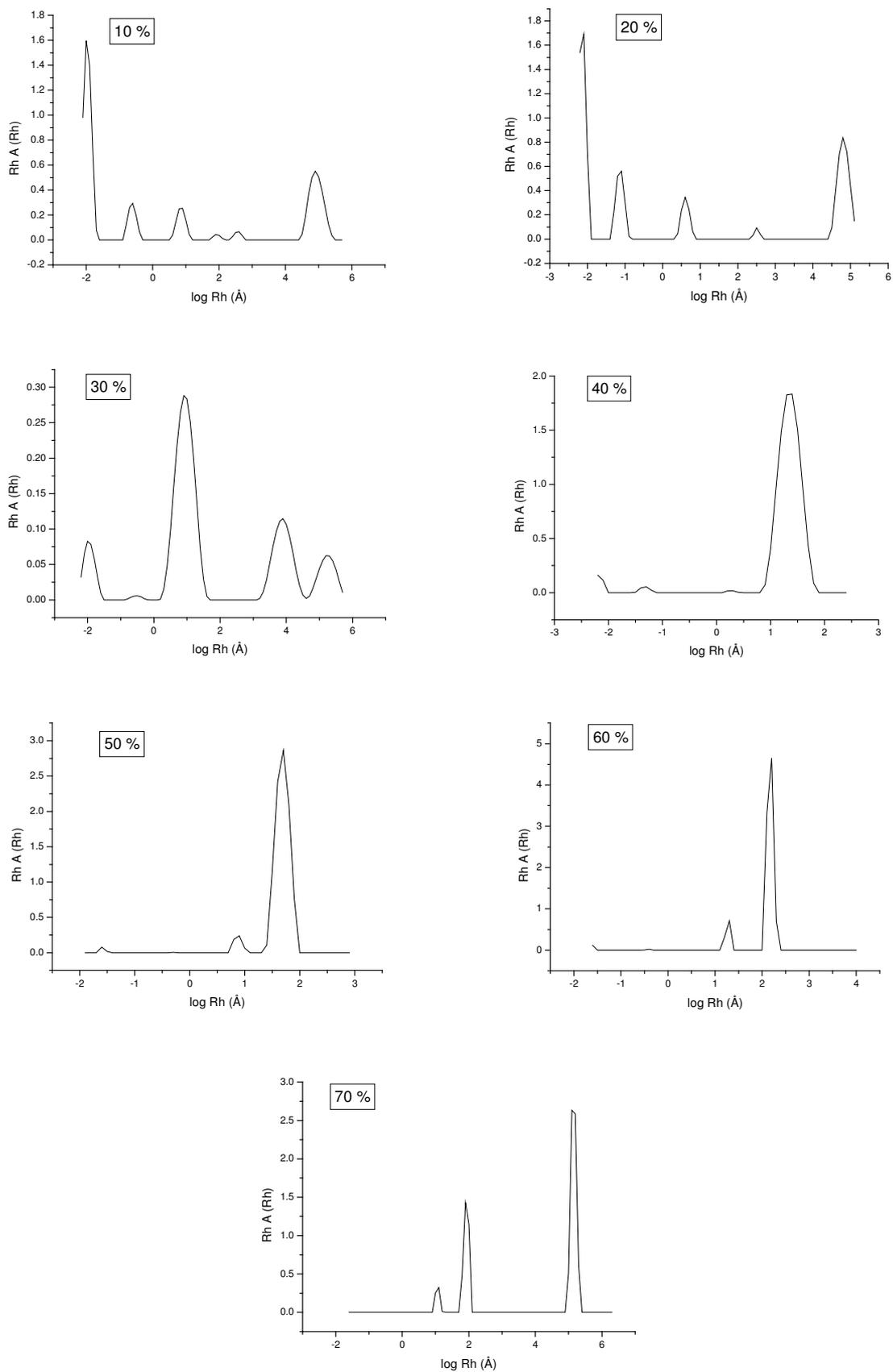


Figura 11. Curvas de correlação das medidas de DLS realizadas em ângulo de  $35^\circ$  para MEs com composições de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 % em água e 1/4 em SDS/pentanol.

### II.3.1.2 Voltametria Linear

A Figura 12 mostra os resultados de voltametria linear para misturas de SDS/pentanol 1:4 com diferentes teores de água. O experimento foi feito em célula com três eletrodos de Pt, a uma velocidade de varredura do potencial de  $1 \text{ mV s}^{-1}$  na faixa de potenciais anódicos, para todos os teores de água investigados.

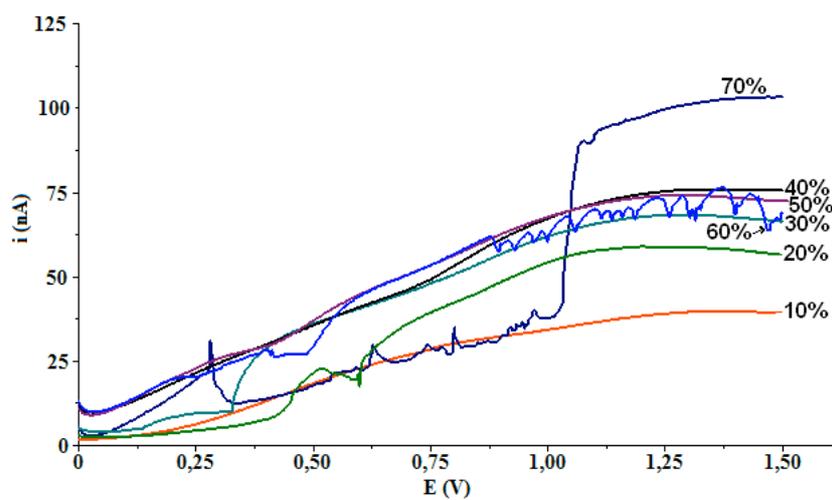


Figura 12. Voltamogramas de misturas de 1:4 SDS/pentanol em uma de Pt com  $10 \mu\text{m}$  de diâmetro *versus* *quasi*-referência de Pt, para diferentes teores de água.

Os voltamogramas correspondentes aos sistemas contendo acima de 50 % de água apresentam oscilações na corrente, indicando que a reação de oxidação da água, evidenciada pelo aumento gradual da corrente, pode estar sendo dificultada pela formação de um filme resultante da adsorção do ânion dodecilsulfato sobre a superfície do eletrodo. Realizou-se medidas voltamétricas de soluções contendo apenas SDS em água onde se observou um comportamento acentuado de oscilação da corrente a partir de 1,0 V. Isto evidencia a ação do SDS, possivelmente seu ânion, sobre a superfície do eletrodo interferindo assim, na reação da oxidação da água.

### II.3.1.3 Coeficiente de Difusão

Para as MEs investigadas, o coeficiente de difusão translacional das gotículas,  $D$ , foi calculado pela equação de Stokes-Einstein (Equação 9) utilizando os valores de raio hidrodinâmico obtidos por DLS para diferentes teores de água, conforme mostra a Figura 13. Já o coeficiente de difusão obtido por medidas eletroquímicas,  $D_{el}$ , foi calculado pela equação de Cottrell (Equação 10) para um ume a partir da corrente limite,  $i_{lim}$ , obtida na região do potencial de oxidação da água, calculado para 1/2 do valor de  $i_{lim}$  obtidos dos voltamogramas da Figura 12.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (9)$$

$$D_{el} = \frac{i_{lim}}{4\eta FC^* r_{el}} \quad (10)$$

onde  $T$  é a temperatura absoluta,  $k$  a constante de Boltzmann,  $\eta$  a viscosidade do solvente,  $r$  e  $r_{el}$ , os raios da gotícula e do eletrodo, respectivamente,  $F$  a constante de Faraday e  $C^*$  o teor de água no seio da solução.

A Figura 14 evidencia que há uma diminuição do  $D_{el}$  com o aumento do teor de água, já que a água está localizada no interior das gotículas as quais tem sua mobilidade diminuída por se tornarem maiores.

Os valores de  $D$  e  $D_{el}$  apresentam, de modo geral, um comportamento semelhante em relação ao teor de água, como mostrado nas Figuras 13 e 14.

Na Figura 13, há uma aparente anomalia em relação à diferença entre os valores de  $D$  para as MEs contendo 10 e 20 % de água, porque, como evidenciado na Figura 7, neste caso, a composição contendo 10 % de água está na fronteira de miscibilidade onde a tendência de separação de fases é grande. Nesta região ocorre forte dispersão de valores de raio hidrodinâmico, como visualizado na Figura 11 a). Além disso, nesta faixa de concentração existem valores muito pequenos de raio (na ordem de  $10^{-1}$  nm), portanto com maior incerteza no valor do parâmetro. Por outro lado, com o aumento do teor de água, a massa das gotículas também aumenta, diminuindo sua mobilidade e, conseqüentemente, o coeficiente de difusão.

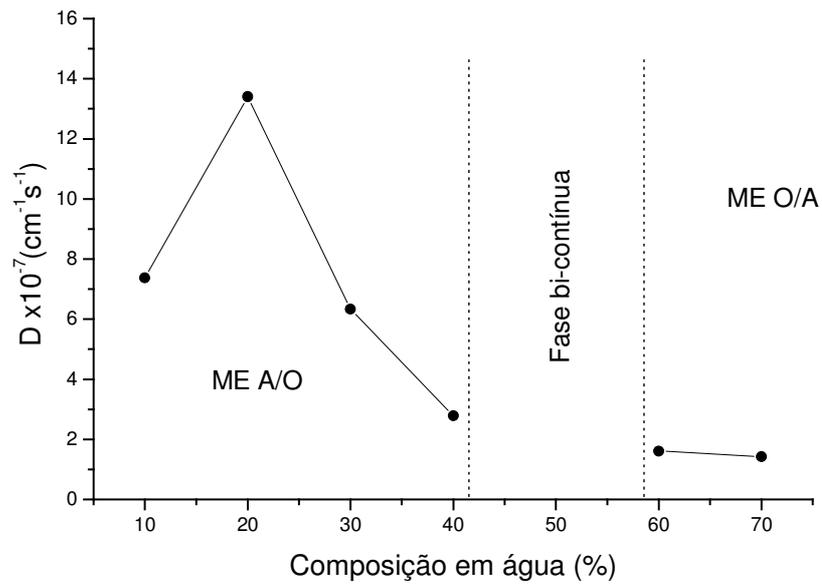


Figura 13. Variação de  $D$  versus teor de água em ME constituídas de água e 1:4 SDS/pentanol, obtido através da Equação 9.

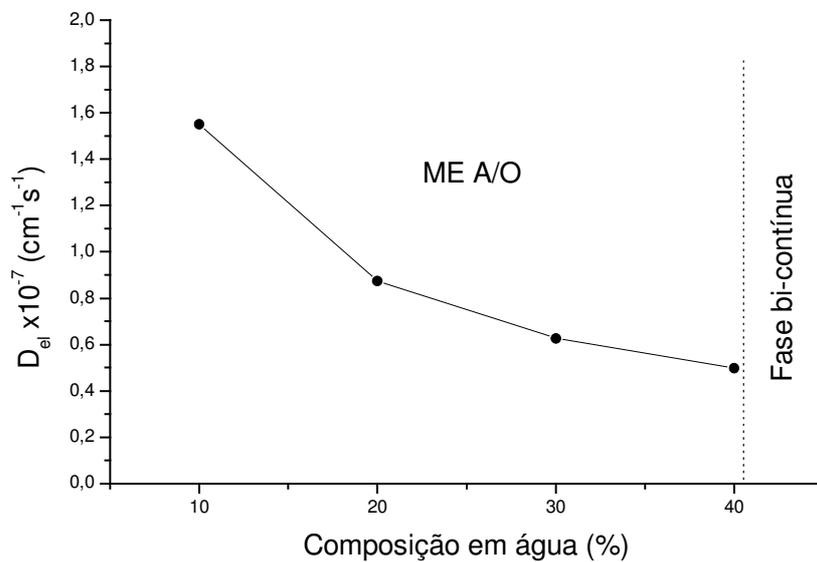


Figura 14. Variação de  $D_{el}$  versus composição de água em ME constituídas de água e 1:4 SDS/pentanol, obtido através da Equação 10.

A diferença na ordem de grandeza entre  $D$  e  $D_{el}$  para MEs de água em óleo, o segundo menor do que o primeiro, deve-se ao deslocamento das gotículas até a superfície do eletrodo

associado ao rompimento da barreira de surfactante-cosurfactante envolvendo a gotícula, que deve ocorrer para que haja a oxidação da água.

#### II.3.1.4 Raio das Gotículas

Com os valores de coeficiente de difusão obtidos por voltametria ( $D_{el}$ ), a partir da equação de Cottrell (Equação 10), calcularam-se os raios das gotículas de ME A/O contendo até 40 % de água empregando a equação de Stokes-Einstein (Equação 9). Para MEs O/A e A/O os valores de raio geométrico foram obtidos pela equação de Bragg (Equação 4) e o raio hidrodinâmico pelo programa REPES. Na Figura 15 estão representados os gráficos do raio das gotículas em função do teor de água nas diferentes MEs.

Comparados aos valores do raio geométrico, verifica-se que aqueles obtidos eletroquimicamente para MEs contendo até 40 % de água são de 3 a 4 vezes maiores. Já os valores do raio hidrodinâmico são apenas duas vezes maiores após a região bicontínua, mas na mesma faixa para a região A/O, ambos em relação aos valores obtidos por SAXS. Fica evidente que estes três valores de raio expressam informações diferentes da estrutura das gotículas de cada uma das ME. Mediante SAXS, o valor do raio expressa, provavelmente, a densidade eletrônica da interface gotícula/meio contínuo da ME. Na obtenção dos valores do raio hidrodinâmico obtidos pela equação de Stokes-Einstein é considerado, além do valor da viscosidade, o coeficiente de fricção, que está relacionado com a camada de solvatação das gotículas de ME. Já o valor do raio obtido eletroquimicamente expressa os efeitos da carga e da massa das gotículas de água em seu deslocamento até a superfície do eletrodo sob ação do campo elétrico aplicado. A expressão da mobilidade das gotículas está relacionada com os efeitos de carga e fricção conforme a Equação 11, abaixo:

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (11)$$

onde  $q$  representa a carga líquida,  $\eta$  e  $r$ , a viscosidade e o raio iônico, respectivamente. A velocidade da gotícula ( $v$ ), sob ação de um campo elétrico, está relacionada com sua mobilidade pela expressão:

$$v = \mu E \quad (12)$$

onde  $E$  é o campo elétrico aplicado.<sup>40</sup>

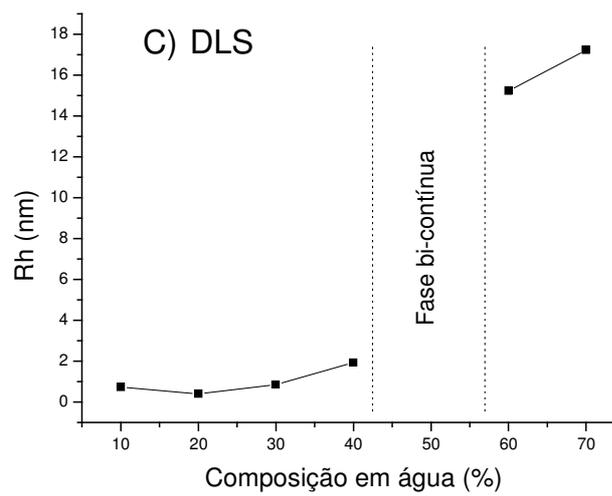
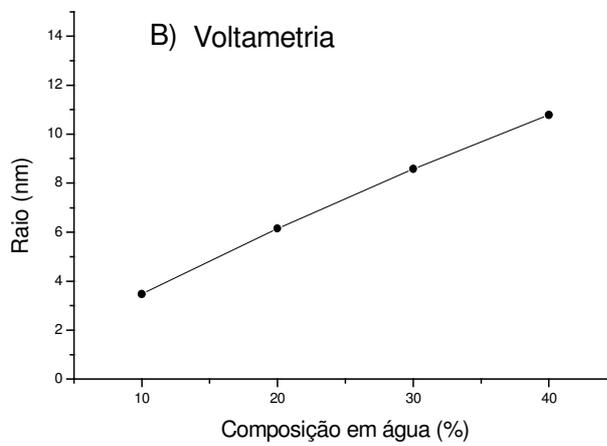
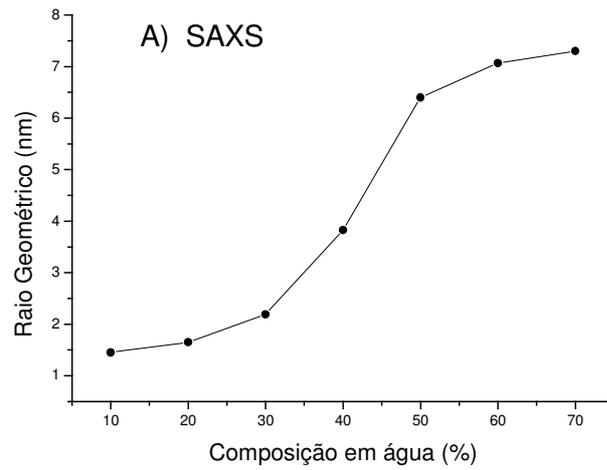


Figura 15. (a) Raio geométrico, (b) Raio das gotículas de microemulsão A/O e (c) Raio hidrodinâmico.

Na obtenção dos valores do raio por DLS empregando o programa REPES há a possibilidade de visualização da dispersão das intensidades relacionadas a tamanhos variáveis de gotículas, como visto na Figura 11 no item II.3.1.1, com indicação dos valores de raio mais prováveis. No entanto, a faixa de bicontinuidade não é representada no gráfico com o raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) porque o mesmo está relacionado na equação de Stokes-Einstein (Equação 9) com o coeficiente de fricção do movimento Browniano, enquanto numa fase bicontínua representada por canais, não devem haver gotículas, desta forma não se pode considerar o movimento Browniano das mesmas.

Já os valores obtidos por SAXS fornecem uma média dos picos relacionados aos valores de raio das gotículas.

### II.3.1.5 Carga Flutuante

A carga flutuante das gotículas foi calculada com os dados de raio hidrodinâmico obtidos por DLS e por voltametria segundo a equação proposta por Eicke e col,<sup>10</sup>

$$\langle z^2 \rangle = \frac{4\pi k_B T \epsilon_0 \epsilon r}{e^2} \quad (13)$$

onde  $\epsilon$  é a permissividade relativa do solvente,  $\epsilon_0$  a permissividade no vácuo e  $e$  a carga elementar eletrônica.

A partir da equação de Stokes-Einstein (Equação 9) e empregando os valores de raio hidrodinâmico obtidos por DLS foram calculados os coeficientes de difusão ( $D$ ) das gotículas das MEs A/O, os quais diminuem com o aumento do teor de água (ver Figura 13), enquanto sua carga flutuante média ( $\langle Z^2 \rangle$ ) (Equação 13) aumenta com o aumento do raio, como mostra a Figura 16.

A Figura 16 indica um aumento brusco no valor da carga flutuante das gotículas de ME no intervalo de 40 % a 50 % de água. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que, acima de 50 % de  $H_2O$ , a ME é do tipo O/A e a região polar do SDS está voltada para o meio aquoso (ver Figura 1.c).

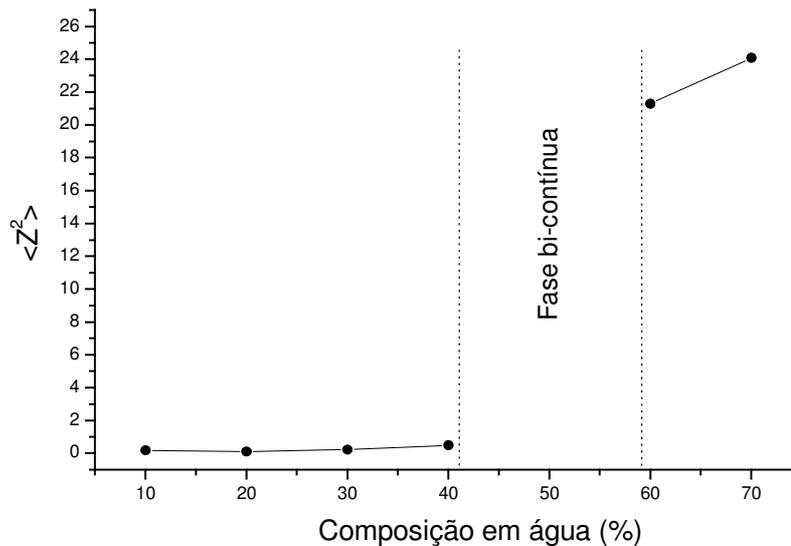


Figura 16. Variação de  $\langle Z^2 \rangle$  versus teor de água na ME calculados a partir de medidas de DLS.

Com a equação de Cottrell (Equação 10) obteve-se diretamente os valores do coeficiente de difusão por voltametria, e posteriormente, os valores do raio correspondente empregando a Equação de Stokes-Einstein (Equação 9). Os valores da carga flutuante média ( $\langle Z^2 \rangle$ ) foram obtidos pelo emprego destes valores na Equação 13. O comportamento da carga flutuante média com a variação na composição de água nas microemulsões encontra-se na Figura 17.

A região de O/A não foi representada pelo fato das informações dos valores de coeficiente de difusão obtidos estarem relacionados com a reação da água na superfície do eletrodo. Em regiões de O/A, a fase aquosa está no meio contínuo, sendo que as informações dos valores de coeficiente de difusão não estão relacionados com a gotícula da microemulsão, ou seja, a reação da água não depende do deslocamento da gotícula de ME do seio da solução até a superfície do eletrodo.

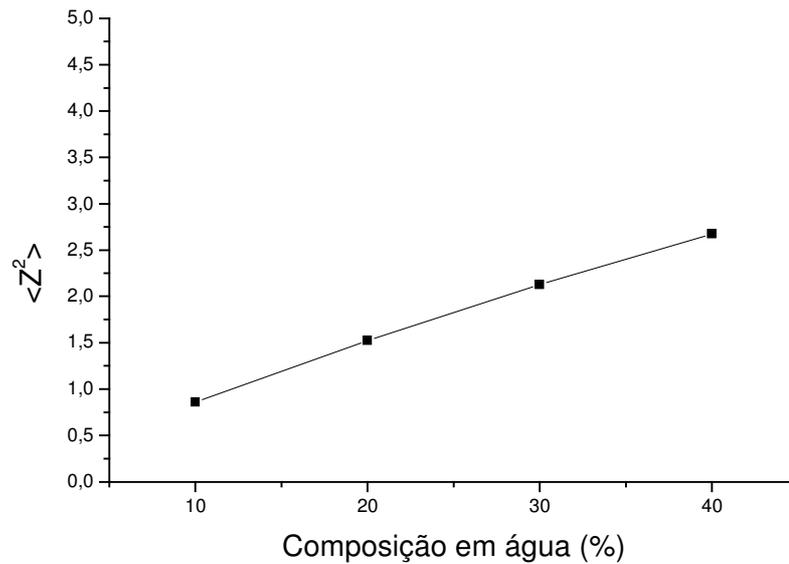


Figura 17. Variação de  $\langle Z^2 \rangle$  versus composição de água na ME obtido a partir de medidas voltamétricas.

A carga flutuante média foi calculada a partir do raio das gotículas. Como o raio obtido por voltametria é da ordem de 3 a 4 vezes maior em comparação com o raio geométrico, então, provavelmente, a carga flutuante média está relacionada com a atmosfera iônica envolvida na solvatação da gotícula. A tendência da carga flutuante média é aumentar com o raio, porém para composições entre 10 e 40 % de água este aumento é menos expressivo, o que pode estar relacionado com o aumento simultâneo do número de gotículas.

### II.3.1.6 Fração Volumétrica das Gotículas

A partir dos valores de condutividade e raio hidrodinâmico obtidos experimentalmente foi calculada, a partir da Equação 2, a fração volumétrica das gotículas,  $\phi$ , cuja variação em função do teor de água nas MEs é apresentada na Figura 18.

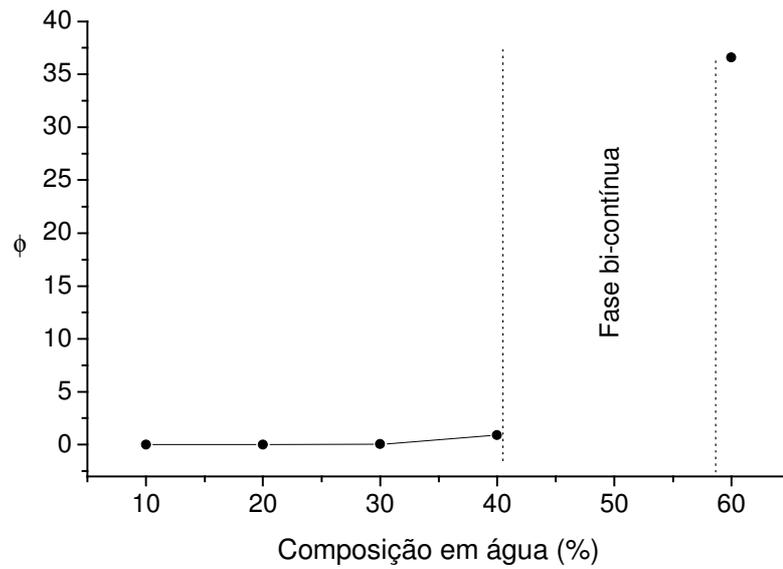


Figura 18. Variação da fração volumétrica  $\phi$  das gotículas nas MEs *versus* teor de água.

Com os valores de fração volumétrica obtidos foi possível calcular o número de gotículas por unidade de volume ( $\rho$ ). Supondo que as gotículas sejam esféricas tem-se:

$$\rho = \frac{3\phi}{4\pi r^3} \quad (14)$$

A Figura 19 mostra a variação de  $\rho$  com o teor de água.

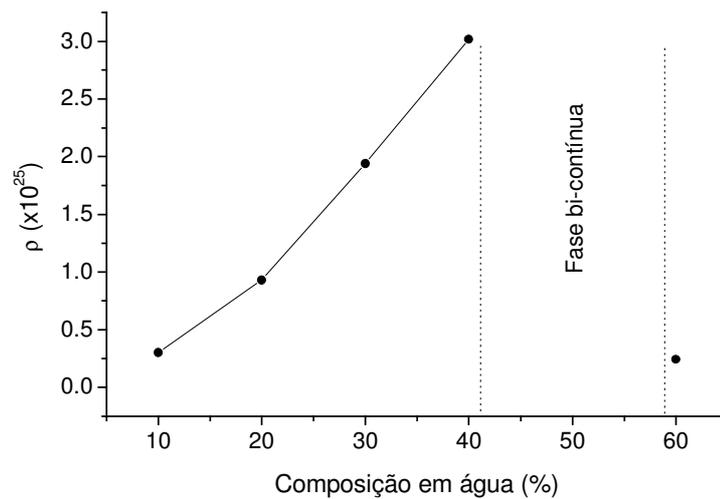


Figura 19. Variação do número de gotículas  $\rho$  por unidade de volume com o teor de água em MEs.

A partir do modelo de flutuação de carga da gotícula, observa-se um aumento do número de gotículas por unidade de volume com o aumento do teor de água, (Figura 19) e, concomitantemente, há um aumento no raio da gotícula (Figura 15). A Equação 2 mostra a condutividade inversamente relacionada com a terceira potência do raio da gotícula, significando que um aumento deste deveria diminuir acentuadamente aquele parâmetro. No entanto, simultaneamente, como visto na Equação 13, há um aumento da carga da gotícula com o raio  $e$ , assim, a condutividade elétrica da solução aumenta.

Por outro lado, à medida que o raio da gotícula aumenta, deve aumentar também o número de moléculas do surfactante e do cosurfactante na interface água/óleo, a fim de manter sua estabilidade em decorrência do aumento da tensão superficial (Lei de La Place). A questão que se coloca é: de onde vem a quantidade adicional de SDS para suprir sua deficiência na fronteira polar/apolar da gotícula, decorrente do aumento do raio  $e$  e do número de gotículas por unidade de volume ( $\rho$ ) na ME ?

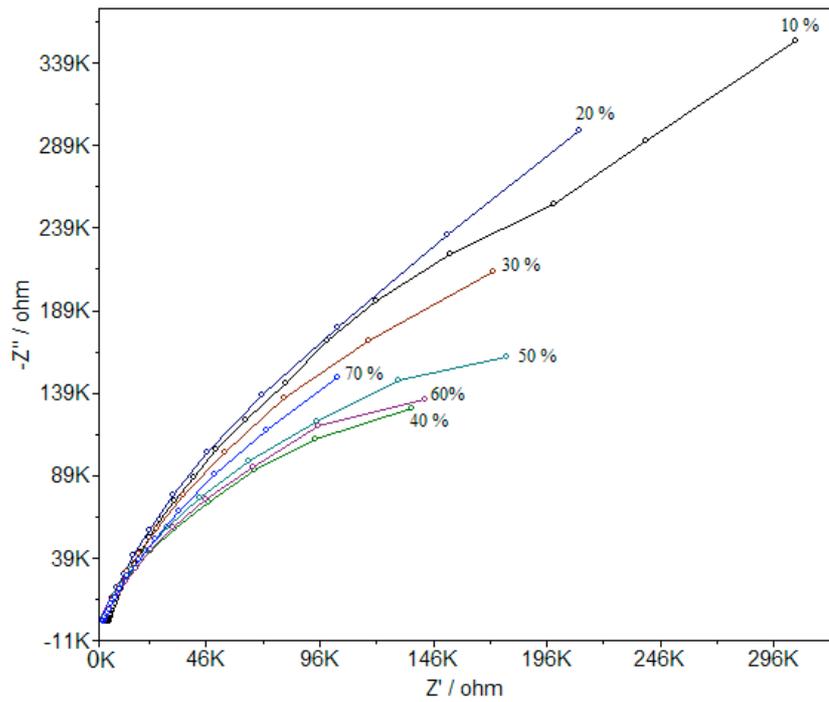
Testes empíricos (observação visual) mostraram que a molécula de SDS não é solúvel em pentanol enquanto sua solubilidade em água<sup>41</sup> é da ordem de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Portanto, íons dodecilsulfato estão presentes na fase aquosa, no seio da gotícula. Em baixos teores de água, por exemplo 10 %, esperar-se-ia que um maior número de íons dodecilsulfato solvatados estivessem dentro da gotícula. No entanto, como a concentração de SDS é elevada em relação à da água, a concentração excedente de SDS que não pode ser solubilizada no seio da gotícula encontra-se provavelmente sob forma de micela já que, nas condições do experimento, a concentração do SDS está acima da concentração crítica micelar que é de  $8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Este comportamento é evidenciado nos resultados obtidos por DLS, onde se observa que, com o aumento do teor de água, há uma diminuição no número de picos referentes ao espalhamento oriundo de diferentes tamanhos de agregados, como observado na Figura 11. Ao longo das medidas empregando teores de água variáveis, observou-se também a presença de sinais de intensidade elevada, relacionados a tamanhos micrométricos. Este fato pode estar associado à formação de vesículas maiores com a aglomeração de gotículas.

Por outro lado, é possível que, à medida que o raio da gotícula e o número de gotículas por unidade de volume aumentam em razão da adição de água ao meio, íons dodecilsulfato agregados em micelas desloquem-se do seio da solução para a interface gotícula/meio contínuo, estabilizando-a relativamente à tensão superficial que aumenta com o raio. Concomitantemente, com o aumento do teor de água pode ocorrer uma diminuição da concentração de íons dodecilsulfato na fase contínua pela quebra das micelas, acarretando um aumento da permissividade relativa e diminuição da viscosidade, em concordância com a

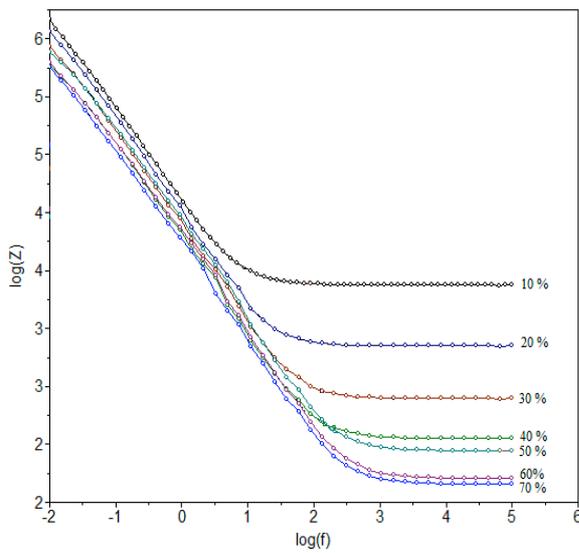
variação dos valores de condutividade encontrados (Equação 2 e Figura 8). Esse comportamento também é observado nos valores das correntes de oxidação da água por voltametria (Figura 12).

### **II.3.1.7 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica**

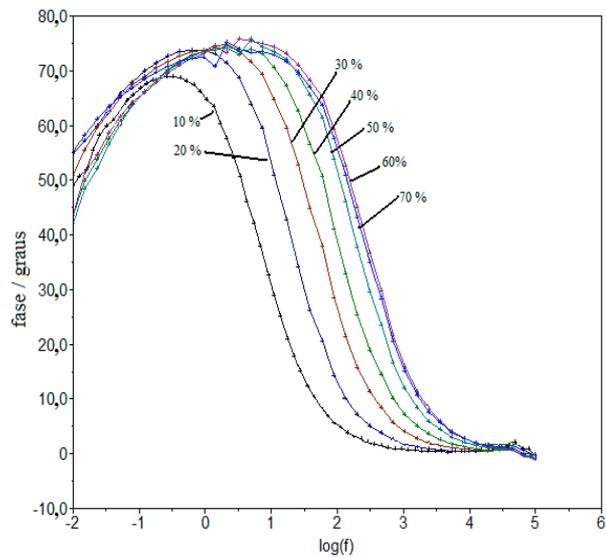
Medidas de EIE foram feitas em soluções de MEs contendo 1:4 em SDS/pentanol com variação do teor de água de 10 a 70% empregando um ume e um contra-eletrodo, ambos de Pt. O diagrama de Nyquist (Figura 20 a) obtido mostra um arco capacitivo que não se completa em baixas frequências. Este arco é atribuído a uma resistência, em altas frequências, associada em paralelo a uma capacitância. A resistência está relacionada com a condutividade do meio enquanto a capacitância é consequência do alinhamento de cargas na dupla camada elétrica, na interface ume/solução. Na região de baixas frequências, observa-se uma função linear no gráfico de Nyquist provavelmente devido a uma impedância relacionada a processos de transporte de massa, do seio da solução até a superfície do microeletrodo. Quanto maior o teor de água, maior a inclinação observada na região de baixas frequências. Este comportamento está relacionado com a dificuldade do transporte de massa das gotículas da microemulsão, bem como com mudanças nas propriedades físico-químicas da solução (constante dielétrica, viscosidade e coeficiente de difusão). Pelo gráfico de Bode (Figura 20a), ao variar o teor de água de 10 a 70 % observa-se uma diminuição nos valores de resistência da solução, em altas frequências, e conseqüentemente um aumento na contribuição capacitiva, (Figura 20b) um comportamento que está relacionado principalmente à variação da constante dielétrica do meio.



(A)



(B)



(C)

Figura 20. Diagramas de Nyquist (A) e Bode (B) e (C) de MEs de proporções constantes em SDS/1-pentanol 1:4, variando o teor de água entre 10 e 70%. Microeletrodo de trabalho de Pt com 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

A fim de aprofundar o estudo do meio acima descrito relativo à variação da permissividade com o teor de água foi construída uma célula de três eletrodos de platina, dois

eletrodos de disco com 2 mm de diâmetro, como trabalho e referência, respectivamente, paralelos, permitindo a variação da distância entre eles, e um contra-eletrodo. Uma representação esquemática desta célula pode ser visualizada na Figura 21. Os resultados são mostrados na Figura 22.

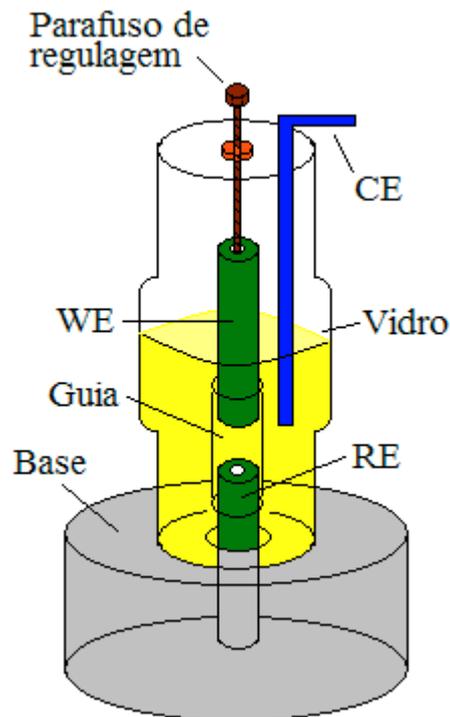


Figura 21. Representação esquemática da célula de três eletrodos de platina com distância variável entre o eletrodo de trabalho (WE) e o eletrodo de referência (RE). CE representa o contra eletrodo.

A equação que relaciona a permissividade com a capacitância é dada por:

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d} \quad (15)$$

Onde C, d e A representam respectivamente a capacitância, a distância entre as placas de um capacitor e a área das placas onde  $\epsilon_0$  é a permissividade no vácuo e  $\epsilon$  a permissividade relativa. A permissividade do meio é dada por:

$$\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r \quad (16)$$

Com as medidas de capacitância obtidas do gráfico de Bode para distâncias arbitrariamente escolhidas de 1; 2,5 e 4,5 mm entre os eletrodos de trabalho e referência verificou-se que a relação entre permissividade e o teor de água em microemulsões A/O é linear e que os valores da permissividade relativa do meio aumentam com a distância entre os eletrodos para uma mesma composição em razão do aumento da capacitância.

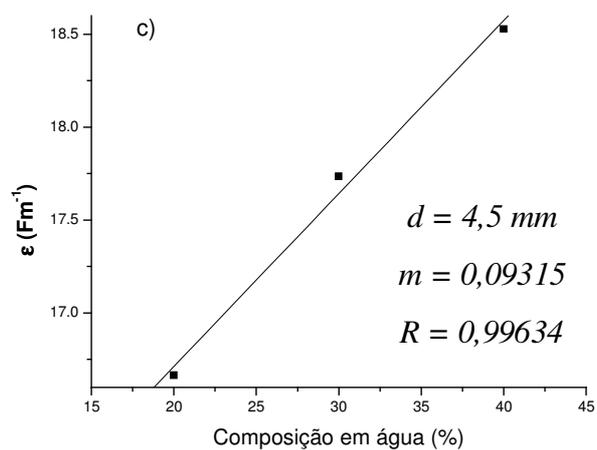
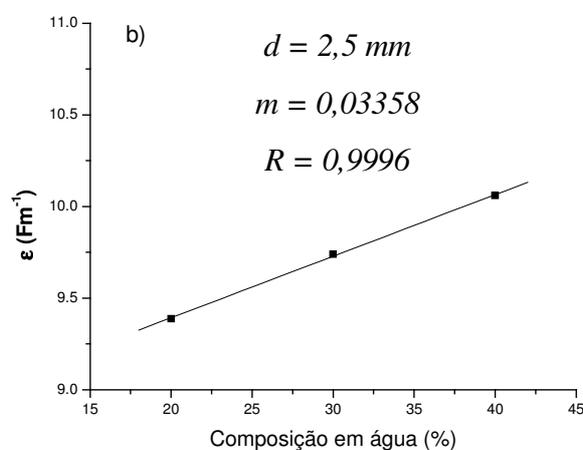
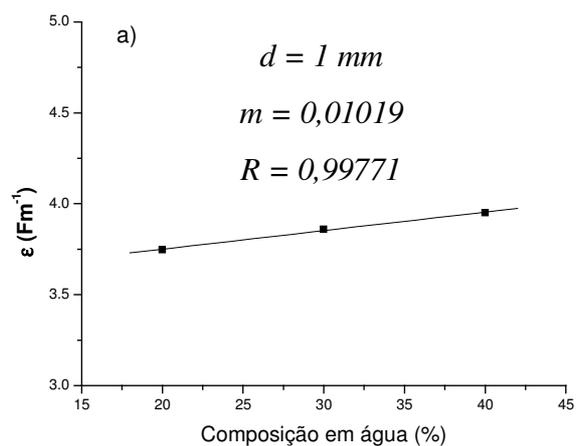


Figura 22. Variação da permissividade do meio com a composições de MEs A/O para diferentes distâncias ( $d$ ) entre o eletrodos de disco de Pt de trabalho e o de referência, ambos com 2 mm de diâmetro, onde  $m$  e  $R$  representam a inclinação da reta e coeficiente de correlação, respectivamente.

O aumento observado na inclinação da função permissividade do meio *versus* teor de água com a distância entre os eletrodos indica a possibilidade de determinação de água em meios hidroorgânicos por medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica.

### II.3.2 Caracterização de ME Contendo 20 % de Óleo de Soja

Um estudo da condutividade elétrica de MEs frente à natureza do cosurfactante, realizado anteriormente<sup>14</sup> no Laboratório de Eletroquímica do IQ-UFRGS empregou sete álcoois com cadeias lineares e ramificadas, como mostram a Figura 23 e a Tabela II. Entretanto, para viabilizar a formação de microemulsões com todos os álcoois propostos e assim poder comparar os resultados, foi preciso fixar o teor de óleo de soja (OS) em 20 %. Nestas condições, o tamanho das gotículas diminuiu, o que aumenta a incerteza dos dados obtidos por DLS, razão pela qual foram realizadas medidas por SAXS, com a participação do autor, no Laboratório Nacional de Luz Sinchrotron, em Campinas, SP.

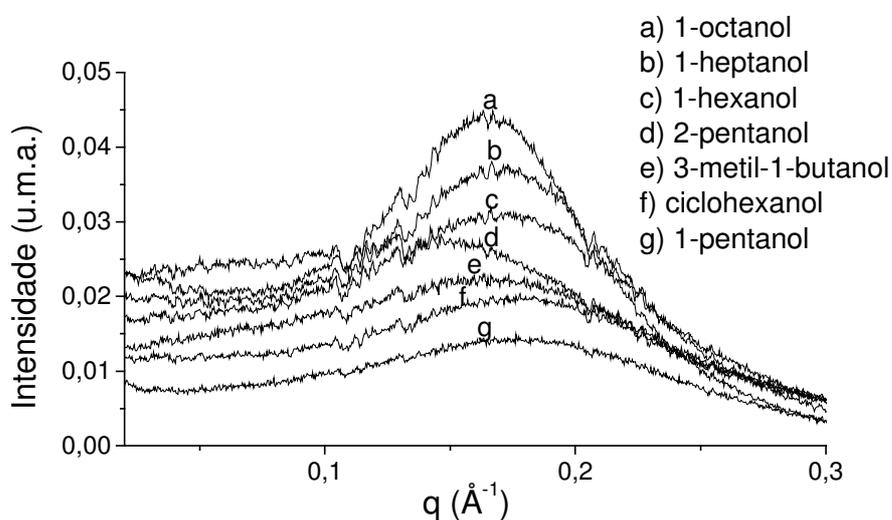


Figura 23. Intensidade vs.  $q$  para medidas por SAXS em microemulsões A/O preparadas com diferentes cosurfactantes. Composição das MEs: 8 %  $H_2O$ , 14,2 % SDS, 20 % OS e 57,8 % de cosurfactante.<sup>14</sup>

A Tabela II mostra que, à medida que aumenta a cadeia linear dos álcoois, há um aumento do raio geométrico das gotículas e uma diminuição da condutividade das MEs<sup>14</sup>, em concordância com os valores de permissividade relativa menores, conforme evidenciado pela Equação 2. Adicionalmente, verifica-se que, apesar da semelhança de comportamento na variação dos parâmetros correspondentes aos gráficos nas Figuras 24 a e b, o valor da permissividade relativa dos álcoois não está diretamente relacionado com a condutividade das MEs.

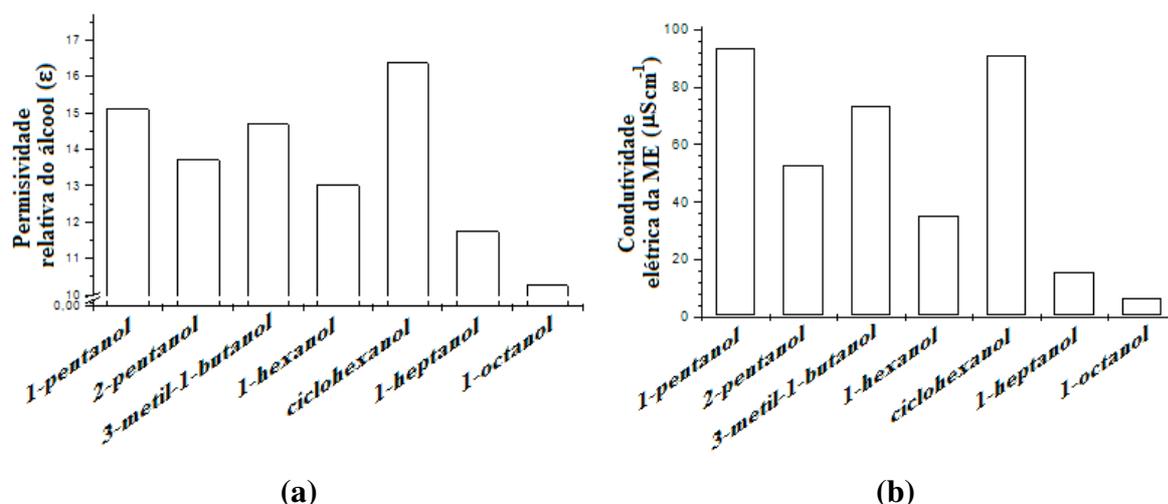


Figura 24. a) Permissividade relativa do álcool e b) Condutividade elétrica das MEs correspondentes, contendo 8,0 % de H<sub>2</sub>O, 14,2 % de SDS, 20,0 % de óleo de soja e 57,8 % de cosurfactante.

Um estudo mais detalhado mostra que parâmetros como a viscosidade do cosurfactante, o raio da gotícula, o qual depende da estrutura da molécula do álcool e, em menor contribuição, a solubilidade deste em água, também influem no valor da condutividade da ME. Por exemplo, a diferença de 8 % entre os valores de permissividade, maior para o ciclohexanol (16,40) do que para o 1-pentanol (15,13), diminui para 3 % para a condutividade, a qual é maior para a ME preparada com 1-pentanol, evidenciando que, neste caso, o fator viscosidade é determinante.

Na tabela II está indicada ainda a solubilidade dos álcoois em água. Pode-se admitir que, quanto maior o valor deste parâmetro, maior a quantidade de álcool dissolvida na região interfacial da gotícula de água. Em consequência, seu raio aumenta, ainda que de modo não muito pronunciado.

Tabela II. Resultados experimentais para MEs contendo 8,0 % H<sub>2</sub>O, 14,2 % SDS, 20,0 % óleo de soja (OS) e 57,8 % de cosurfactante, preparadas com diferentes cosurfactantes na proporção 1:4 SDS:álcool: raio geométrico R, condutividade elétrica  $\kappa$  e viscosidade  $\eta$ . Dados da literatura para os cosurfactantes: viscosidade  $\eta_a$ , solubilidade em água e  $\epsilon$  permissividade relativa.

Cosurfactante	R (nm)	<sup>1</sup> ME $\kappa$ ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	<sup>1</sup> ME $\eta$ (cP)	<sup>2</sup> Álcool $\eta_a$ (cP)	<sup>3</sup> Solubilidade do álcool em água ( $\text{g L}^{-1}$ )	<sup>3</sup> Álcool $\epsilon$
1-pentanol	1,6	93,8	9,8	3,619	27	15,13
2-pentanol	1,9	53,0	9,1	3,470	135	13,71
3-metil-1-butanol	1,7	73,5	10,3	3,692	25	14,70
1-hexanol	1,7	35,1	11,8	4,578	5,8	13,03
ciclohexanol	1,6	91,0	35,1	57,50	40	16,40
1-heptanol	1,7	15,5	16,6	5,810	1	11,75
1-octanol	1,8	6,4	23,8	7,298	Insolúvel	10,30

1-Ref. 14; 2-Ref. 41; 3-Ref. 42.

Quando o cosurfactante é o 2-pentanol, a condutividade da ME é em torno de duas vezes menor do que quando preparada em 1-pentanol, comportamento que está relacionado com a menor permissividade relativa e o maior raio geométrico da gotícula na ME, provavelmente em razão de um efeito estérico.

Já o 3-metil-1-butanol, em comparação ao 1-pentanol, confere às MEs valores de viscosidade levemente maiores, apesar de sua permissividade relativa apresentar um valor intermediário entre o 1-pentanol e o 2-pentanol. No entanto, a diferença é muito pequena para explicar a queda significativa na condutividade da ME preparada com esse cosurfactante. Por outro lado, a distribuição dos contra-íons nas gotículas de MEs A/O é determinada pelo grau de dissociação do surfactante. Para a maioria dos surfactantes o grau de distribuição de cargas das microemulsões em água muda com a adição de álcoois.<sup>43</sup>

Ao compararmos os valores de condutividade das MEs preparadas com hexanol e com ciclohexanol observamos uma diferença marcante. Apesar do alto valor de viscosidade, a ME contendo ciclohexanol apresenta maior condutividade. Isto pode ser explicado, em parte, pelo

alto valor da permissividade relativa deste álcool, o que favorece a percolação da fase aquosa pela fase contínua, causando o aumento na condutividade da ME A/O.

Por outro lado, comparando os raios das gotículas e as condutividades das MEs preparadas com 3-metil-1-butanol e 1-hexanol obtivemos valores de raio geométrico iguais, enquanto os de condutividade foram muito diferentes. Este comportamento evidencia a complexidade das propriedades das MEs, influenciadas, além do raio da gotícula, pela permissividade elétrica e viscosidade do meio hidrodinâmico bem como do grau de ionização do surfactante e do cosurfactante.

Finalmente, a queda na condutividade da ME preparada com 3-metil-1-butanol em comparação àquela contendo 1-pentanol pode ser atribuída a um efeito estérico bem como ao grau de ionização do SDS, levando a uma diminuição no número de gotículas carregadas na ME.

Estes resultados constituem um aprofundamento no conhecimento das características de microemulsões. A importância da natureza do co-surfactante na interface água/óleo foi demonstrada, especialmente o papel de sua estrutura e do comprimento da cadeia carbônica como parâmetros extremamente significativos no comportamento físico-químico das MEs.

Apesar das similaridades observadas em diagramas de fases (resultados não mostrados) as MEs preparadas com água, óleo de soja, SDS e 1-pentanol ou 3-metil-1-butanol como cosurfactantes mostraram diferenças marcantes, especialmente em condutividade. Considerando que as polaridades destes álcoois são muito próximas, a diferença no tamanho das gotículas foi atribuída a efeitos estéricos.

Quanto ao desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas em MEs aplicadas ao controle de qualidade de óleo de soja, o 1-pentanol mostra-se mais adequado como cosurfactante do que o 3-metil-1-butanol devido aos maiores valores de condutividade apresentados pelas MEs A/O.

Finalmente, características das microemulsões que não poderiam ser observadas por cada uma das técnicas isoladamente, seja eletroquímicas, DLS ou SAXS, foram evidenciadas pela comparação dos resultados obtidos através das mesmas.

## CAPÍTULO III

### CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA CAPILAR

#### III.1 Introdução

Em estudo anterior<sup>14</sup>, envolvendo a separação e identificação de espécies dissolvidas no óleo de soja por eletroforese capilar em meio não aquoso, foi constatado que não houve a separação dos triacilgliceróis presentes na amostra (Figura 25). Isto pode ser atribuído ao fato destas espécies serem eletricamente neutras e apresentarem estruturas que variam de acordo com a natureza dos ácidos graxos ligados à molécula (Figura 5).

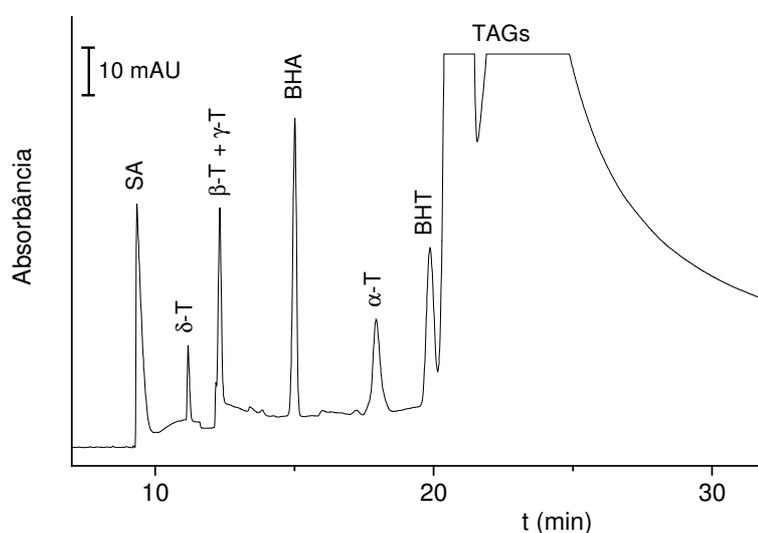


Figura 25. Eletroferograma de óleo de soja refinado aditivado com ácido salicílico (SA), tert-butil-hidroxianisol (BHA) e 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT); eletrólito de corrida constituído por uma solução  $4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  KOH em uma mistura de metanol/ propanol (15:85, v/v); e detector UV em  $220 \text{ nm}^{14}$ .

### III.2 Materiais e Métodos

No preparo dos padrões e do eletrólito de corrida para as medidas de EC utilizou-se hidróxido de sódio de pureza 97 % (Nuclear, São Paulo, Brasil); água destilada e deionizada; 1-butanol 99,5 % de pureza (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil); ácido oléico (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) e ácido palmítico (SIGMA-ALDRICH, Malásia).

Utilizou-se óleo de soja comercial refinado e desodorizado, envasado em embalagem metálica, obtido do comércio local.

-Eletroforese capilar:

As medidas de eletroforese capilar foram realizadas com um aparelho de EC<sup>44</sup> construído no laboratório (ver Figura 26 abaixo) com capilar de 45 cm no total, sendo 35,5 cm até o detector e com diâmetros de 50  $\mu\text{m}$  e 150  $\mu\text{m}$ , interno e externo, respectivamente. O condicionamento do capilar foi realizado aplicando vácuo de -450 mm Hg e injetando água, NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e eletrólito de corrida, cada um por 5 min, nesta ordem.

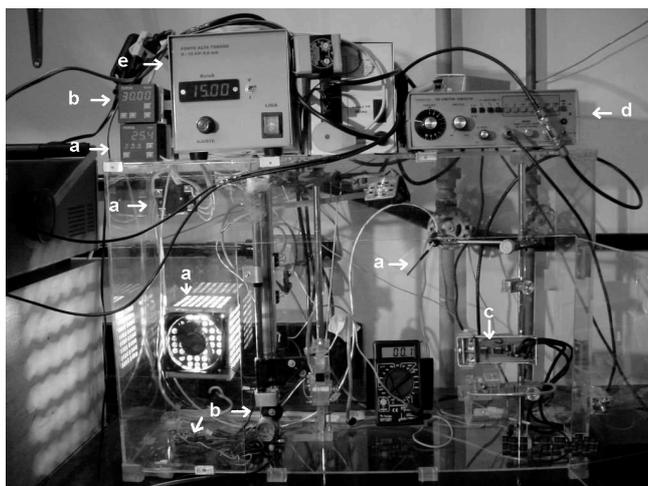


Figura 26: Aparelho de EC construído no laboratório, a) controle de temperatura; b) sistema de injeção; c) detector oscilométrico, d) gerador de funções; e) fonte de alta tensão.

-Determinação do número de acidez:

O procedimento utilizado requer o preparo de um reagente especial para extração da porção ácida empregando benzoato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup> dissolvido em álcool isopropílico:água, 1:1, v/v, cujo pH é ajustado até um valor ótimo (9,87) com solução de KOH 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Para a verificação do pH desta mistura adiciona-se 50 mL deste reagente especial numa porção de 5 gramas da amostra de óleo de soja. Agita-se por 3 minutos e mede-

se o pH<sub>1</sub>. Em seguida, adicionam-se 200 µL de HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup> padronizado e mede-se o pH<sub>2</sub>. A determinação do ΔpH é obtida da diferença entre os valores de pH<sub>1</sub> e pH<sub>2</sub> e o índice de acidez é calculado através da expressão:

$$NA = \frac{56,11 \times N_{st} \times V_{st}}{m \times (10^{\Delta pH} - 1)} \quad (17)$$

onde N<sub>st</sub> e V<sub>st</sub> são respectivamente a concentração molar e o volume, em mL, adicionado do ácido padronizado; 56,11 é a massa molar do KOH e m a massa da amostra de óleo de soja.

### **III.3 Discussão dos Resultados**

#### **III.3.1 Cromatografia Eletrocinética Capilar em Microemulsões de Água em Óleo**

Estudos preliminares por Cromatografia Eletrocinética Capilar foram realizados tendo por objetivo a separação e detecção oscilométrica (condutométrica) de ácidos graxos livres como ácido oléico e ácido palmítico, empregando como eletrólito de corrida um meio contendo 0,81 % de octano, 6,6 % de 1-butanol, 3,3 % de SDS e 89 % de tampão tetraborato de sódio 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> com pH 9,5<sup>34</sup>. Os padrões dos ácidos oléico e palmítico foram preparados separadamente em solução metanólica, nas concentrações de 5,7x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> e 4,6x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. As medidas foram realizadas com tempo de até 60 minutos. No entanto, a separação dos AGL não ocorreu nestas condições, conforme mostrado na Figura 27, (a e b).

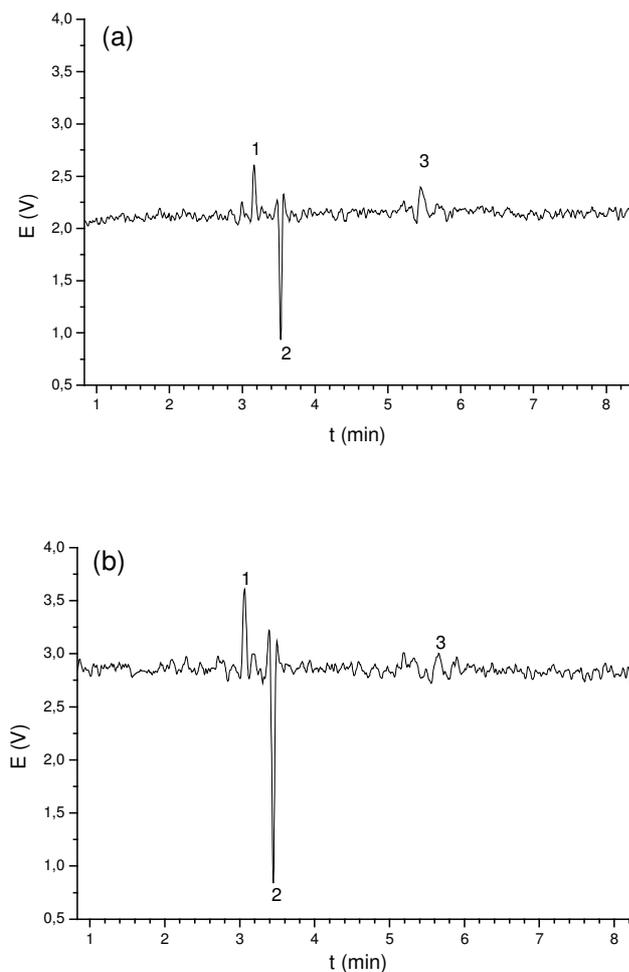


Figura 27. Eletroferogramas das amostras adicionadas a 1.500  $\mu\text{L}$  de eletrólito de corrida: (a) 40  $\mu\text{L}$  de metanol; (b) 40  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de ácido oléico  $5,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  e 40  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de ácido palmítico  $4,6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .

Os eletroferogramas obtidos com a adição de 40  $\mu\text{L}$  de metanol ou de 40  $\mu\text{L}$  de cada uma das soluções metanólicas dos ácidos oléico e palmítico, simultaneamente, ao eletrólito de corrida, apresentam os picos 1, 2 e 3 da Figura 27 os quais são equidistantes em relação ao tempo de migração, e podem, portanto, ser considerados picos do sistema.

A ausência dos picos dos padrões pode ser atribuída a fatores como, por exemplo, o fato das gotículas terem cargas semelhantes (ME contendo componentes da amostra/ME do eletrólito de corrida); os ácidos graxos podem permanecer no “plug” da amostra ou a sensibilidade do detector é insuficiente para estes analitos. Em decorrência destes resultados, foi realizado um estudo mais aprofundado das propriedades físico-químicas das gotículas no sistema microemulsionado.

Para uma mistura de 60 % butanol, 30 % de SDS e 10 % de uma solução  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> de borato em água empregada como eletrólito de corrida, a injeção hidrodinâmica tornou-se inviável num tempo de 40 segundos e 10 cm de altura, provavelmente devido à alta viscosidade do meio. Mudando a composição do eletrólito para 76 % butanol, 6 % SDS e 18 % borato  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>, quando aumenta a tensão de separação, aumenta também o ruído da linha base e a condutividade térmica diminui a ponto de formar bolhas dentro do capilar por efeito Joule. Por sua vez, a diminuição da tensão de separação, diminui consideravelmente o fluxo eletroosmótico.

Foi também empregado como eletrólito de corrida um meio contendo 70 % de dimetilformamida (DMF), 10 % de SDS, 10 % de butanol, 10 % de uma solução  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> de borato em água e 0,4 % de beta-ciclodextrina ( $\beta$ -CD), em massa, observou-se que, acima de 8 kV um superaquecimento por efeito Joule, provavelmente em razão da alta resistividade térmica da mistura.

Outro meio investigado foi pentanol/solução  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> de borato em água 1:1 (fase bicontínua) e 10 % de SDS. Neste caso, aparentemente não há FEO e, para tensões maiores (20 kV), há formação de bolhas. É provável que os prótons resultantes da dissociação do hidrogênio ácido do pentanol, no limite das fases de bicontinuidade, neutralizem os sítios negativos da parede de sílica do capilar.

### III.3.2 Eletroforese Capilar em Meio Hidroorgânico

Dentre as misturas de solventes e reagentes testados (anilina, pentanol, hexano, SDS, beta-ciclodextrina, tampão borato, isopentanol, etilenoglicol, etanol, acetonitrila, metanol, butanol, brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB), DMF, benzoato de sódio e NaOH  $0,1$  mol L<sup>-1</sup>) nenhuma produziu resultados satisfatórios. A mistura que melhor atendeu a alguns dos requisitos, mencionados no item I.7.3, para o uso como eletrólito de corrida, foi aquela contendo 50% de NaOH  $0,05$  mol L<sup>-1</sup>, 30 % de DMF e 20 % de butanol. Os eletroferogramas resultantes apresentaram baixo ruído da linha base, porém o tempo de corrida mostrou-se relativamente alto. Os padrões de ácidos graxos foram dissolvidos diretamente no eletrólito de corrida, sendo este um requisito essencial para emprego do método.

No transcorrer das análises muitos parâmetros, tais como tensão de separação, tempo e altura de injeção, limpeza do capilar entre corridas, verificação da presença de bolhas, período de renovação do eletrólito de corrida nos reservatórios e no capilar e a composição do próprio

eletrólito de corrida devem ser ajustados. Devem ainda ser monitorados a estabilidade da corrente de separação no capilar, bem como a continuidade da linha base e o ruído.

Dentre os parâmetros citados, a principal fonte de incerteza nos resultados está na preparação do capilar. O corte do capilar deve produzir uma superfície lisa, de modo que a base e as paredes estejam geometricamente perpendiculares. Este fato passou despercebido em boa parte das medidas iniciais realizadas, tendo-se verificado mais recentemente a importância deste parâmetro. Algumas destas medidas, cujas condições estão especificadas na Tabela III são mostradas na Figura 28. Nos eletroferogramas obtidos com o eletrólito 50 % de NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup>, 30 % de DMF e 20 % de butanol sem o preparo adequado da extremidade do capilar observa-se a formação de um degrau. Quando a extremidade do capilar é lixada após o corte, apesar da falta de instrumentação adequada para obter um corte mais regular, a influência deste fator é visivelmente atenuada, embora ainda influa nos resultados.

Tabela III. Condições das medidas realizadas em capilar de 50/150 µm, diâmetros interno e externo, separação em 10 kV, 0,8 µA com detecção catódica e injeção de amostra em 18 cm por 30 s (exceto para a medida “a”). Eletrólito de corrida: 50 % NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup>, 30 % DMF e 20 % butanol.

Medidas	Ác. oléico 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>	Ác. palmítico 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>	Observações
a	0	0	Eletrólito de corrida em 16 cm por 10 s; tensão de separação 15 kV e 15 µA; capilar não lixado
b	1,69	1,54	Capilar não lixado
c	8,45	3,60	Capilar não lixado
d	8,45	7,70	Teste de limpeza do capilar com HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> após NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup> ; capilar não lixado
e	8,45	7,70	Lixamento da extremidade anódica do capilar (injeção)
f	8,45	7,70	Afastamento de 1 cm entre extremidades capilar/eletrodo de separação; capilar lixado

Os eletroferogramas apresentados na Figura 29a, cujas especificações estão na Tabela IV, mostram que o pico correspondente ao ácido oléico dissolvido no eletrólito de corrida é visualizado em 41 minutos a partir de 1,7x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, aproximadamente. Neste caso, a linha base não evidencia nenhum sinal decorrente de irregularidade na superfície da extremidade do

capilar. Após certo tempo de uso, observa-se novamente a formação do degrau, como mostrado na Figura 29b para o eletroferograma 7. Uma vez lixado novamente o capilar, evidencia-se novamente um melhor perfil da linha base (eletroferograma 8).

A Figura 29b mostra os eletroferogramas de amostras de ácido palmítico dissolvido no eletrólito de corrida, em diversas concentrações. Observa-se um pico bem definido a partir de uma concentração aproximada de  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , em torno de 50 minutos.

Tabela IV. Condições das medidas realizadas em capilar 50/150  $\mu\text{m}$  diâmetros interno/externo, separação em 12 kV, 12  $\mu\text{A}$  com detecção catódica e injeção de amostra em 18 cm por 30 s. Eletrólito de corrida: 50 % NaOH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , 30 % DMF e 20 % butanol.

Medida	Ác. oléico $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	Ác.palmítico $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
1 *	0	0
2	0,56	0
3	1,69	0
4	3,90	0
5	8,45	0
6	3,90	3,60
7	0	0,51
8	0	0,51
9	0	1,54
10	0	3,60
11	0	7,70
12	1,69	1,54

\* Somente eletrólito de corrida

O aumento gradativo do sinal da linha base pode estar relacionado com o tempo necessário para o eletrólito de corrida atingir um equilíbrio térmico com as paredes do capilar sob efeito do campo elétrico aplicado e para a estabilização da temperatura do próprio equipamento. Ainda assim, há um aumento da temperatura dentro do capilar por efeito Joule. Quando amostras contendo ambos os padrões foram injetadas não ocorreu a separação dos ácidos graxos como mostram as Figuras 29a e 29b. Este fato pode estar relacionado com a formação de aglomerados de moléculas dos dois ácidos graxos, inviabilizando a separação nestas condições experimentais.

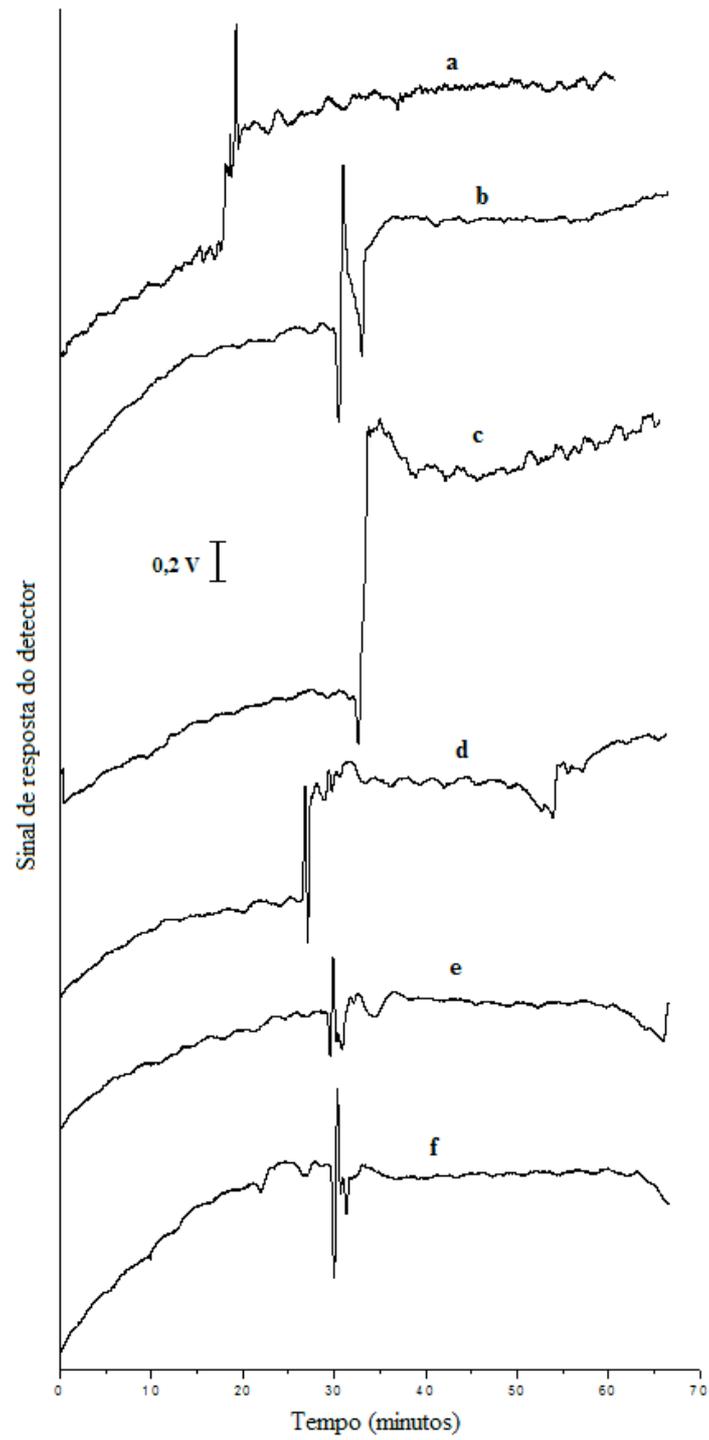


Figura 28. Eletroferogramas de medidas realizadas nas condições especificadas na Tabela III (a ao f).

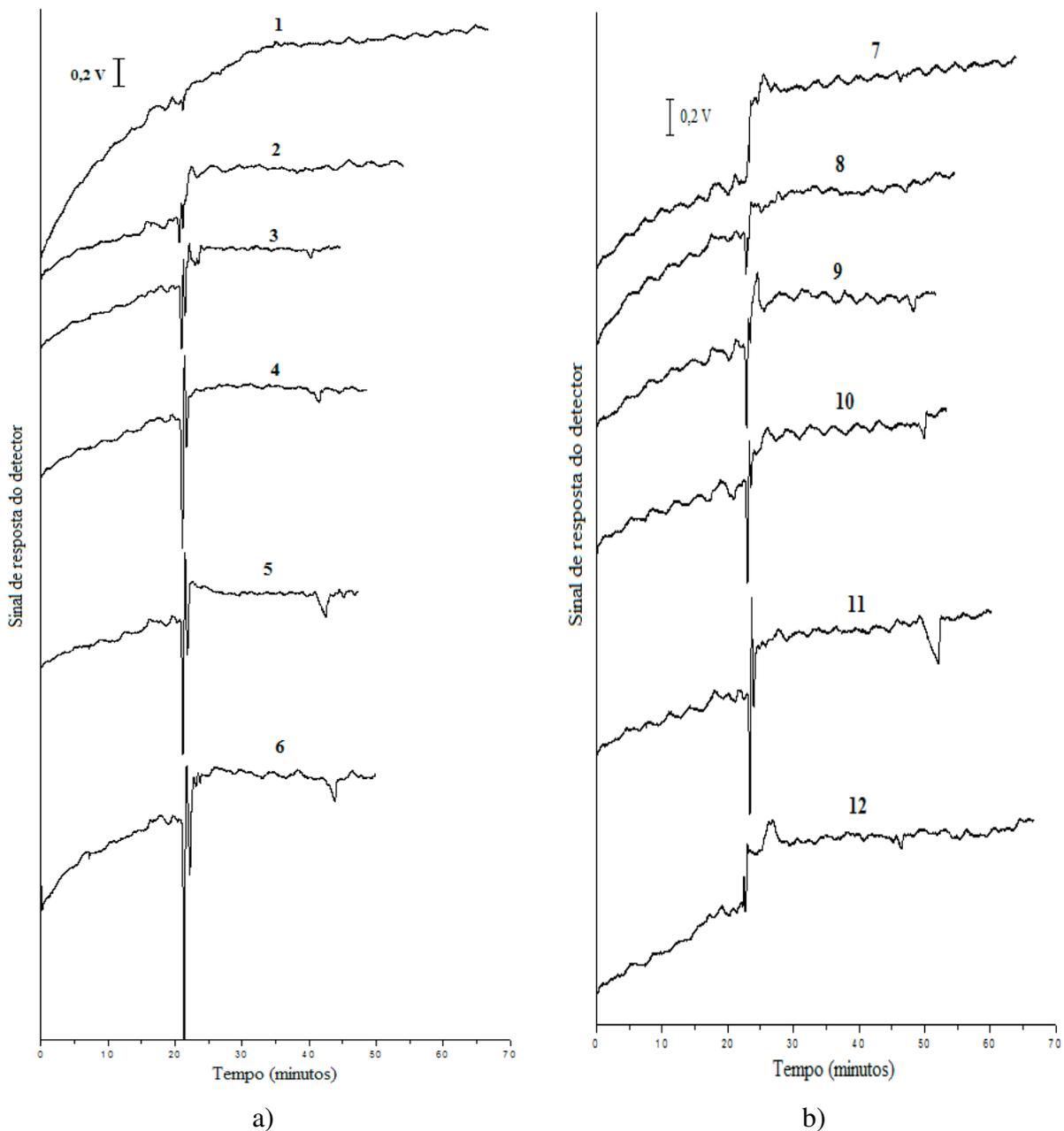


Figura 29. Eletroferogramas de medidas cujas especificações encontram-se na Tabela IV (1 ao 12).

Os eletroferogramas nas condições de 1 a 5, bem como de 7 a 11 na Tabela IV, indicam um pequeno aumento no tempo de migração dos picos correspondentes aos ácidos oléico e palmítico com o aumento da concentração, o que pode ser atribuído ao aumento da viscosidade do *plug* da amostra.

O tempo de migração para ambos os ácidos difere em 5 minutos, aproximadamente, sendo mais longo para o ácido palmítico. Pelo comprimento da cadeia carbônica de ambos

(C16 para o palmítico e C18 para oléico) seria de esperar um maior tempo de migração para o ácido oléico. Este eletrólito de corrida contém DMF e butanol os quais, em meio alcalino, comportam-se como bases de Lewis. Portanto, sob ação de um campo elétrico, é de esperar que a migração destas duas bases aconteça no sentido anódico, ou seja, no sentido oposto ao do FEO. Sendo este maior no sentido do cátodo, as duas bases de Lewis são arrastadas levando consigo moléculas solvatadas de ácido graxo. Quando moléculas maiores, como o ácido oléico, são solvatadas pelas bases de Lewis, o arraste pelo FEO é mais efetivo diminuindo assim o tempo de migração frente às espécies de cadeia menor como o ácido palmítico.

Os ácidos graxos apresentam propriedades tensoativas com tendência à formação de aglomerados de moléculas de ácidos graxos em meio aquoso ou misturas que apresentam propriedades semelhantes a este meio. A separação das moléculas aglomeradas torna-se praticamente impossível pelo fato das micelas serem formadas por diferentes moléculas de ácidos graxos, o que pode influenciar em maior grau numa separação por MEKC ou MEEKC.

Neste caso, os resultados evidenciam a viabilidade de detecção de ácidos graxos, porém o tempo de análise é longo.

### III.3.3 Eletroforese Capilar em Meio Não Aquoso

Para diminuir o tempo de análise testou-se um meio não aquoso como eletrólito de corrida constituído de  $\text{KOH } 4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  em metanol/propanol na proporção de 1:6, respectivamente, contendo 10 % de etilenoglicol. A adição de etilenoglicol tem por objetivo uma maior estabilização da mistura (na ausência de etilenoglicol o meio, mantido em temperatura ambiente, mostrou-se instável após três horas). O meio alcoólico inverte o sentido do fluxo eletrosmótico formado dentro do capilar e a base aumenta a condutividade do meio. As condições de separação utilizadas foram otimizadas e os melhores resultados obtidos para a tensão de separação de -25 kV, 40 cm de comprimento do capilar e 30 s de tempo de injeção da amostra a uma altura de 10 mm. Na detecção, o sinal de emissão de frequência foi de 550 kHz numa amplitude de 8 V. Entre as corridas, o capilar foi lavado com solução etanólica de 4% em KOH e 10 % em água.

A curva de calibração foi preparada com a adição do padrão ácido oléico nas concentrações de 0; 5,3; 10,7; 16,0 e  $21,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em misturas do eletrólito de corrida e 50 g  $\text{L}^{-1}$  de amostra de óleo de soja. Inicialmente, os valores da curva de calibração não

apresentaram linearidade sendo este comportamento atribuído à interação da matriz da amostra com o padrão adicionado. Com o aumento da concentração de ácido oléico nas soluções padrão alguns parâmetros físico-químicos como viscosidade e permissividade relativa podem estar sendo significativamente modificados. Além disso, a interação amostra/ácido oléico pode apresentar comportamento não linear com relação à variação da composição em ácido oléico. Frente a isto, empregou-se ácido salicílico na concentração de  $1,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  como padrão interno.

Na Figura 30 está representado um eletroferograma de uma solução com  $5,3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  em ácido oléico e  $1,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em ácido salicílico no eletrólito de corrida contendo  $50 \text{ g L}^{-1}$  de amostra de óleo de soja. O eletrólito de corrida é constituído de  $\text{KOH } 4 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  em metanol/propanol na proporção de 1:6, respectivamente e 10 % em etilenoglicol. Observa-se uma boa separação dos picos referente ao ácido salicílico e do ácido oléico em tempos de migração de 13 e 16 minutos, respectivamente. O tempo de análise mostrou-se relativamente curto comparando-se ao sistema hidroorgânico apresentado no item III.3.2. O pico de maior intensidade (19 minutos) pode estar relacionado aos demais compostos que permanecem no *plug* da amostra. As medidas foram realizadas em triplicata.

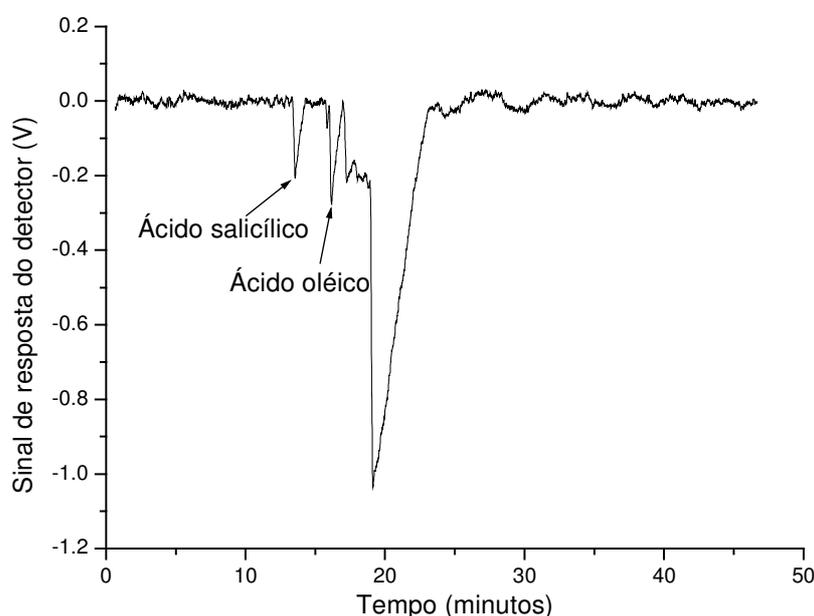


Figura 30. Eletroferograma de uma solução de  $5,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em ácido oléico no eletrólito de corrida contendo  $50 \text{ g L}^{-1}$  de amostra de óleo de soja e  $1,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em ácido salicílico como padrão interno. Eletrólito de corrida:  $\text{KOH } 4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  em metanol/propanol na proporção de 1:6, respectivamente, contendo 10 % de etilenoglicol.

Na Figura 31 observa-se o comportamento não linear da resposta do detector obtida para as soluções padrões nas concentrações de ácido oléico acima descritas ( $S_0$ ) e para as mesmas soluções contendo  $13,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de padrão interno ( $S_I$ ).

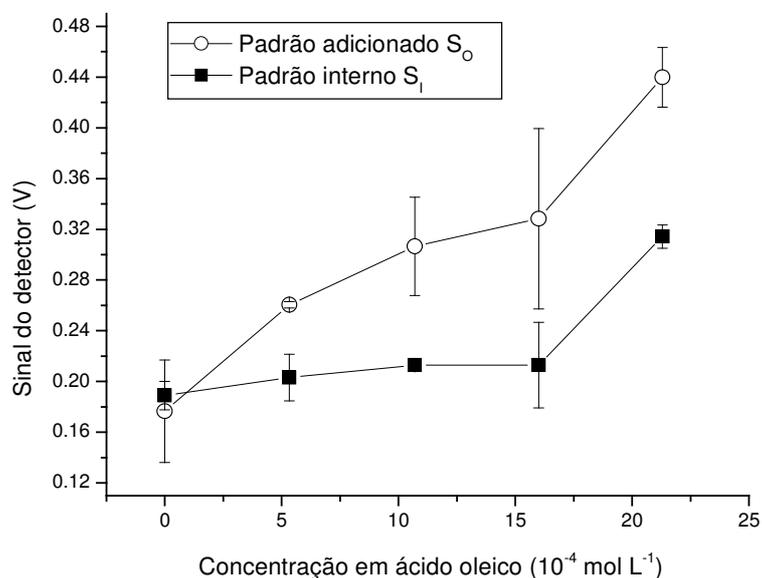


Figura 31. Resposta do detector para o padrão de ácido oléico adicionado e padrão interno. A composição é variável para ácido oléico e fixa para o padrão interno ( $13,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ).

Nos dois experimentos observa-se um comportamento semelhante entre os valores dos sinais obtidos com adição de ácido salicílico ( $S_I$ ), presente em todas as soluções padrão na mesma concentração. Neste caso, a linearidade do sinal de resposta com a concentração de ácido oléico pode ser obtida subtraindo a altura do pico do padrão do ácido graxo daquela do pico do padrão interno, para cada uma das concentrações do padrão adicionado. Observa-se na Figura 31 que a diferença entre os pontos  $S_0$  e  $S_I$  da última medida é de valor semelhante da diferença dos valores da penúltima medida, isto acarreta num declínio da linearidade na curva de calibração. Por este motivo a diferença dos valores  $S_0$  e  $S_I$  para a última medida não foi considerada na curva de calibração. O resultado é mostrado na Figura 32.

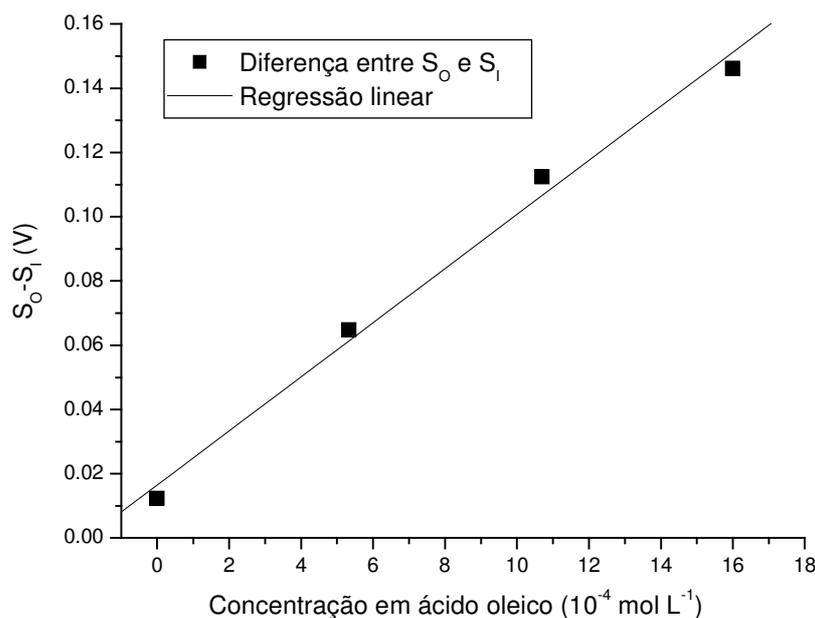


Figura 32. Sinal de resposta obtido a partir da diferença entre os valores da altura dos picos para cada padrão de ácido oléico adicionado e do padrão interno.

A regressão linear  $Y = AX + B$  apresentou um coeficiente de correlação de 0,99565. O cálculo da concentração de ácido oléico, mediante extrapolação, resultou no valor de 0,14 gramas de ácido oléico em 100 gramas de óleo de soja. Este valor está dentro da faixa de concentração de ácido oléico especificada pela norma da ANVISA<sup>45</sup> (que é de 0,3 gramas de ácido oléico por 100 gramas de óleo de soja ou 0,003 mg por g de óleo. No entanto, para a validação do método mostra-se necessária sua comparação com valores obtidos por um método de confronto.

### III.3.4 Determinação do Número de Acidez do Óleo de Soja

Para o óleo de soja, a acidez está delimitada pelo tipo de processamento, isto é, óleo refinado, semi-refinado, degomado e bruto, cuja acidez, expressa em gramas de ácido oléico/100g de óleo, é de 0,3; 0,5; 1,0 e 2,0 respectivamente.<sup>45</sup>

O número de acidez do óleo de soja testado foi determinado pelo método proposto por Kuselman et al.<sup>46</sup> Este método requer o preparo de um reagente especial para extração da porção ácida. O reagente promove a reação ácido-base entre a totalidade dos ácidos ( $\Sigma HAn$ )

contidos na amostra de óleo e a base fraca (ânion do ácido do benzoato, Ben<sup>-</sup>) de acordo com a reação:



O número de acidez do óleo de soja foi de 0,04 mg de KOH por grama de óleo de soja. Este valor é proveniente da dissociação dos ácidos graxos totais do óleo de soja na mistura de 0,05 mol L<sup>-1</sup> de benzoato de sódio em água/propanol enquanto o valor obtido por eletroforese capilar é decorrente da determinação do teor de ácido oléico na amostra de óleo de soja. Estes dois valores não podem ser comparados, uma vez que provêm de diferentes procedimentos de analíticos.

## CONCLUSÕES

O domínio de microemulsões para diversas composições do sistema pentanol, dodecilsulfato de sódio e água foi determinado através do diagrama de fases. Para algumas composições selecionadas no interior deste domínio, observou-se uma tendência de correlação no comportamento entre a variação do raio das gotículas e da condutividade elétrica com o teor de água. Para estas microemulsões, a análise dos resultados à luz dos modelos teóricos disponíveis parece indicar que, além da carga flutuante das gotículas, a condutividade elétrica das microemulsões estaria relacionada com a permissividade relativa e a viscosidade no interior das gotículas.

No estudo por voltametria linear, as MEs contendo acima de 50 % de água apresentaram oscilações na corrente anódica, provavelmente devido à formação de um filme resultante da adsorção do ânion dodecilsulfato sobre a superfície do eletrodo de trabalho. Para teores de até 40 % em água, a reação de oxidação desta é dificultada pela necessidade de rompimento da camada de surfactante/co-surfactante que envolve a gotícula.

Com relação à variação do teor de água, os valores do coeficiente de difusão ( $D_{el}$  e  $D$ ) das gotículas das MEs A/O calculados, respectivamente, a partir de medidas voltamétricas e de DLS, apresentam um comportamento semelhante. No entanto, o raio e a carga flutuante média das gotículas determinados por voltametria linear são maiores do que aqueles determinados por DLS, evidenciando que as diferentes medidas fornecem informações particulares sobre a estrutura das gotículas das MEs. Além disso, a voltametria, técnica rápida e de baixo custo em comparação ao SAXS e DLS, permite estender o estudo destes parâmetros a um maior número de sistemas solventes.

O aumento observado na inclinação da função permissividade do meio *versus* teor de água, indica a possibilidade de determinação de água em meios hidroorgânicos por medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica.

O sistema de composição 8,0 % H<sub>2</sub>O, 14,2 % SDS, 20,0 % óleo de soja e 57,8 % de diferentes cosurfactantes, evidenciou a complexidade das propriedades destas MEs,

influenciadas, além da natureza do surfactante e do co-surfactante, pelo raio da gotícula, permissividade elétrica, viscosidade e grau de ionização do surfactante no meio hidrodinâmico. Verificou-se que a natureza do co-surfactante desempenha papel fundamental nas propriedades das MEs, em especial a condutividade e tamanho das gotículas. A ordem de grandeza destes parâmetros permite a caracterização e análise por técnicas eletroanalíticas, e indica a viabilidade da quantificação de ácidos graxos livres por eletroforese capilar.

Nas condições experimentais deste estudo, a separação dos padrões de ácidos oléico e palmítico de uma mistura de ambos não foi observada para o eletrólito de corrida contendo octano, 1-butanol e SDS em tetraborato de sódio. A ausência dos picos dos padrões na mistura pode ser atribuída a fatores como, por exemplo, a semelhança entre as cargas das gotículas das MEs da amostra e do eletrólito de corrida, Por outro lado, os ácidos graxos podem permanecer no *plug* da amostra misturados às micelas, ou ainda, a sensibilidade do detector pode ser insuficiente para estes analitos.

A mistura contendo 50 % de NaOH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , 30 % DMF e 20 % butanol, utilizada como eletrólito de corrida, mostrou-se adequada na identificação dos picos correspondentes aos ácidos oléico e palmítico, em corridas isoladas, a partir das concentrações  $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em 41 minutos, e  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , porém, o longo tempo de análise (50 minutos, aproximadamente) não é favorável.

A mistura que melhor atendeu aos requisitos necessários para o uso como eletrólito de corrida na determinação da concentração do ácido oléico, no óleo de soja, foi aquela contendo  $4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de KOH em metanol/propanol na proporção de 1:6, respectivamente, e 10 % em etilenoglicol, com um tempo de análise relativamente pequeno, frente ao sistema hidroorgânico. A curva analítica para a determinação de ácido oléico, construída pelo método de adição de padrão, apresentou um coeficiente de correlação de 0,99565 empregando ácido salicílico como padrão interno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boso R.L., Bellin M.S., Miksyk I., Deyl Z.; *J. Chromatogr. A.* **1995**, 709, 11.
2. M .J . Lawrence , G .D . Rees; *Advanced Drug Delivery Reviews.* **2000**, 45, 89.
3. Mendonça C.R.B., Bica C.I.D., Piatnicki C.M.S., Simó-Alfonso E.F., Ramis-Ramos G.; *Electrophoresis.* **2005**, 26, 858.
4. Mendonça C.R.B., Bica C.I.D., Piatnicki C.M.S., Simó-Alfonso E.F., Ramis-Ramos G.; *Electrophoresis.* **2005**, 26, 3307.
5. Miola M. F., Snowden M. J., Altria K. D.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **1998**, 18, 785.
6. Formariz T. P., Urban M. C. C., da Silva Júnior A. A., Gremião M. P. D., de Oliveira A. G.; *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* **2005**, 41, 03, 301.
7. Huang HY., Lai YC., Chiu CW., Yeh JM.; *J. Chromatogr. A.* **2003**, 993, 153.
8. Shinoda K., Lindman B.; *Langmuir.* **1987**, 3, 135.
9. Gradzielski M., Hoffmann H.; *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 2613.
10. Eicke H.F., Borkovec M., Das-Gupta B.; *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 314.
11. Hall D.G.; *J. Phys. Chem..* **1990**, 94, 429.
12. Pan H.Y.; *Chem. Phys. Letters.* **1991**, 185, 344.
13. Berne B. J., Pecora R., *Dynamic Light Scattering*, **2000**, Dover, USA.
14. Mendonça C.R.B.; *Desenvolvimento de metodologia para análise direta de óleos vegetais empregando microemulsões de água em óleo e meios não aquosos.* Tese de doutorado, UFRGS, Porto Alegre - Rio Grande do Sul - Brasil, **2005**.
15. Glatter O., Kratky O.; *Small Angle X-Ray Scattering.* **1982**, Academic Press, New York.
16. Kaler E.W., Bennett K.E., Davis H.T., Scriven L.E.; *Towards understanding microemulsion microstructure: A small-angle x-ray scattering study.* **1983**, 79, 5673.
17. Bard A.J., Faulkner L.R.; *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.* **1980**, John Wiley & Sons, New York.
18. Oldham H.B, Myland J.C.; *Fundamentals of Electrochemical Science.* **1994**, Academic Press: San Diego.
19. Bond A.M., Fleischmann M., Robinson J.; *J. Electroanal. Chem.* **1984**, 168, 299.
20. Farrington A.M., Jagota N., Slater J.M.; *Analyst.* **1994**, 119, 233.
21. Mendonça C.R.B., Bica C.I.D., Piatnicki C.M.S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14, 628.

22. Xie X., Stüben D., Berner Z., Albers J., Hintsche R., Jantzen E.; *Sensors and Actuators B*. **2004**, 97, 168.
23. Belmont-Hebert C., Tercier M.L., Buffle J., Fiaccabrino G.C., Rooijm N.F., Koudelka-Hep M.; *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2949.
24. *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications; Modern Aspects of Electrochemistry*. **2006**, 32, Springer US.
25. [http://www.gamry.com/App\\_Notes/EIS\\_Primer/EIS\\_Primer.htm](http://www.gamry.com/App_Notes/EIS_Primer/EIS_Primer.htm)
26. Zambiazzi R.C.; PhD. Thesis, *The Role of Endogenous Lipid Components on Vegetable Oil Stability*. University of Manitoba, Canada, **1997**.
27. Erim F.B., Xu X., Kraak J.C.; *J. Chromatogr. A*. **1995**, 694, 471.
28. Collet J., Gareil P.; *J. Chromatogr. A*. **1997**, 792, 165.
29. Dong Y.; *Trends in Food Science & Technology*. **1999**, 10, 87.
30. Miksyk I., Deyl Z.; *J. Chromatogr. A*. **1998**, 807, 111.
31. Terabe S., Matsubara N., Ishihama Y., Okada Y.; *J. Chromatogr.* **1992**, 608, 23.
32. Debusschere L., Demesmay C., Rocca J.L., Lachatre G.; *J. Chromatogr. A*. **1997**, 779, 227.
33. Altria K.D.; *J. Chromatogr. A*. **2000**, 892, 171.
34. Altria K.D.; *Chromatographia*. **1999**, 49, 7/8, 457.
35. Altria K.D., Broderick M.F., Power J., Donegan S.; *Electrophoresis*. **2004**, 25, 645.
36. Broderick M., Donegan S., Power J., Altria K.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2005**, 37, 877.
37. Barwick V.J., *Trends in Analytical Chemistry*. **1997**, vol.16, no. 6.
38. Popovych O., Tomkins R.P.T.; *Nonaqueous Solution Chemistry*. John Wiley and Sons. **1981**; Brooklin, USA.
39. Muzikar J., van de Goor T., Gas B., Kenndler E.; *J. Chromatogr. A.* **2001**, 924, 147.
40. Weinberger R. *Practical Capillary Electrophoresis*, **2000**, ed 2, Academic Press, New York.
41. *Catalog of Biochemicals and reagents*. **2001**, Sigma-Aldrich, USA.
42. Budavari, S. (Ed.). *The Merck Index: an encyclopedia of chemical, drugs, and biologicals*. **1996**, 12 th. Merck & CO Inc.: New Jersey.
43. Larsen J.W., Tepley L.B.; *J. Colloid Interface Sci.* **1974**, 49, 113.
44. Böckel W.J., Martini E. A., Samios D, Piatnicki C.M.S.; *Quím. Nova*. **2005**, 28, 1106.
45. Resolução nº 482, de 23 de setembro de **1999**.
46. Kuselman et al, *Journal of AOAC International*, **2000**, Vol.83, no. 2.

## **ANEXO**



## Role of the co-surfactant nature in soybean w/o microemulsions

Carla R.B. Mendonça<sup>a,b</sup>, Yara P. Silva<sup>a</sup>, Wolmir J. Böckel<sup>a</sup>, Ernesto F. Simó-Alfonso<sup>c</sup>,  
Guillermo Ramis-Ramos<sup>c</sup>, Clarisse M.S. Piatnicki<sup>a</sup>, Clara I.D. Bica<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, C.P. 15003, Av. Bento Gonçalves, 9500 Porto Alegre, RS-CEP 91501-970, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, C.P. 354, Campus Universitário, Pelotas, RS-CEP 96010-900, Brazil

<sup>c</sup> Dept. de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de València, E-46100 Burjassot, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 December 2008

Accepted 29 April 2009

Available online 12 May 2009

#### Keywords:

Soybean oil

Microemulsion

Co-surfactant

1-Pentanol

Light scattering

Voltammetry

Electrical conductivity

SAXS

### ABSTRACT

The influence of the co-surfactant on physicochemical properties of w/o soybean oil microemulsions (MEs) has been studied. In spite of the similarity in phase diagrams, the MEs display remarkable differences when examined by electrical conductivity, dynamic light scattering (DLS), small angle X-ray scattering (SAXS) and linear voltammetry. When different short-chain alcohols were employed as co-surfactants, together with sodium dodecyl sulfate (SDS) as surfactant, the DLS results indicated the systems to be monodisperse. Both the electrical conductivity of the MEs and the hydrodynamic radii of the droplets ( $R_H$ ) increased with water content while  $R_H$  diminished as temperature increased, no aggregation or percolation of the droplets being observed. In comparison to w/o MEs prepared with 3-methyl-1-butanol, those prepared with 1-pentanol presented higher electrical conductivity and larger limiting currents at a Pt ultramicroelectrode for oxidation of the water occluded into the particles. Finally, from the electrochemical viewpoint the use of 1-pentanol is recommended, no advantage being gained by using any of the other tested alcohols.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Along the last decades, several new analytical methodologies based on the properties of water–oil interfaces have been developed. These include slow extrusion of water into a non-aqueous phase (and vice-versa) through a capillary [1], the determination of antioxidants in vegetable oils by using micrometric electrodes [2,3] and using microemulsions (MEs) as solvent, reaction, separation and detection media [4–6]. On the other hand, a wide variety of technological, pharmaceutical and biological applications of these systems has been reported [7].

Microemulsions, usually containing water, oil and a surfactant [8–10], are optically transparent, isotropic and thermodynamically stable microheterogeneous dispersions of low viscosity. In order to stabilize the ME and to facilitate dispersion of the surfactant molecules along the interfaces between the continuum and dispersed pseudo-phases, a co-surfactant (usually a short-chain alcohol) is also added [11–13]. The transparency of a ME is a consequence of the small cross-sectional sizes of the dispersed droplets (between 5 and 100 nm), their polydispersity increasing with the magnitude of the droplets [14].

Although a wide variety of hydrophobic solvents has been employed as continuous phases in w/o MEs, the possibility of using

vegetable oils as the oil phase has been scarcely investigated. In this case, potential applications are the electroanalytical characterization of edible oils [15–18], the determination of lipophilic oil components [19], the protection of hydrophilic food additives in hydrophobic matrices [14,20–22], and quality control of biomass derived materials including Diesel fuels [23–25]. On the other hand, the use of vegetable oils as hydrophobic component in MEs is in accordance with the principles of green chemistry as far as they are obtained from renewable sources and are environmentally friendly [26].

Advantages of MEs are their chemical and physical stability, higher electrical conductivities than those showed by most organic solvents, and higher solving power, with the additional capability of simultaneously maintaining hydrophobic and hydrophilic substances in solution [9,15,20]. However, the properties and potential applications of MEs are decisively influenced by the nature of the co-surfactant so that, either from the academic and practical viewpoints, systematic experiments will give useful information on the role of co-surfactants concerning the chemical and physicochemical behavior of these systems [7].

The procedure to prepare water-in-oil (w/o) MEs using soybean oil, sodium dodecyl sulfate (SDS) as surfactant and 1-pentanol or 3-methyl-1-butanol as co-surfactant, has been described in a previous work [27]. Visually transparent and thermodynamically stable MEs were observed between 10 and 70 °C through dynamic light scattering (DLS) measurements which evidenced the nanometric

\* Corresponding author. Fax: +55 5133087304.

E-mail addresses: claraism@iq.ufrgs.br, sidcar@ufpel.edu.br (C.I.D. Bica).

size of the dispersed water droplets. On the other hand, due to the enhanced electrical conductivity provided by the presence of water, electrochemical measurements have been conveniently performed in these media [27]. Moreover, analyses costs and toxicity are lower for w/o MEs in comparison to vegetable oil dilution with hydrocarbons [15,28–30]. At room temperature, the droplets formed in a ME containing 6% water (w/w) and 3-methyl-1-butanol instead of 1-pentanol as co-surfactant presented smaller hydrodynamic radii. [27]. This result evidenced a steric effect in the water droplet/oil interface, leading us to examine further the co-surfactant nature, including the length and shape (linear or branched) of the hydrocarbon chain particularly its role on the structure and on the characteristic physicochemical parameters of these media. Furthermore, aiming the application of MEs to quick electroanalytical characterization of vegetable oils, electrical conductivity has been especially investigated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents, samples and solutions

Refined and deodorized soybean oil stored in metallic containers was obtained in the local market. To prepare the MEs, 99% sodium dodecyl sulfate (SDS) from Merck (Darmstadt, Germany), distilled milli-Q water, and either an analytical grade short-chain alcohol or a glycol were used. The following alcohols and glycols were tested: ethanol, 1-butanol (Synth, São Paulo, Brazil), 2-propanol (Nuclear, São Paulo), 1-pentanol, 1-heptanol, 1-octanol, 1-decanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, cyclohexanol, 3-ethyl-1-heptanol, ethanediol (99–99.5%, Merck), 2-pentanol (99.5%, Acros Organics, Morris Plains, NJ, USA), 1-hexanol (96%, Riedel, Buchs, Switzerland) and diethylene glycol (Reagen, Rio de Janeiro, Brazil).

### 2.2. Instrumentation

DLS measurements were performed with a spectrogoniometer (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, USA) provided with a 264-channel BI-9000 AT digital correlator covering seven decades in delay time (Brookhaven), and a model 170 He–Ne laser from Spectra-Physics (Irvine, CA, USA) with 632.8 nm wavelength. SAXS measurements were carried out at the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brazil), by using the D11A-SAXS1 line of a synchrotron source. The voltammograms were obtained with an EG&G PAR Model 264A potentiostat (Princeton Applied Research, Wellesley, MA, USA). A conductimeter (microCM-2200, Crison, Barcelona, Spain), and a Brookfield LVDV-II+ viscosimeter (Middleboro, MA, USA) were also used.

### 2.3. Procedures

To prepare the w/o MEs, soybean oil was added to a mixture of water, SDS and alcohol under continuous magnetic stirring. The SDS/alcohol ratio was 1:4 (w/w) in all cases, the visual transparency of the system indicating ME formation. To construct pseudo-ternary phase diagrams, the mixtures were weighed after each addition, most experiments being performed with MEs containing either 40% or 20% soybean oil.

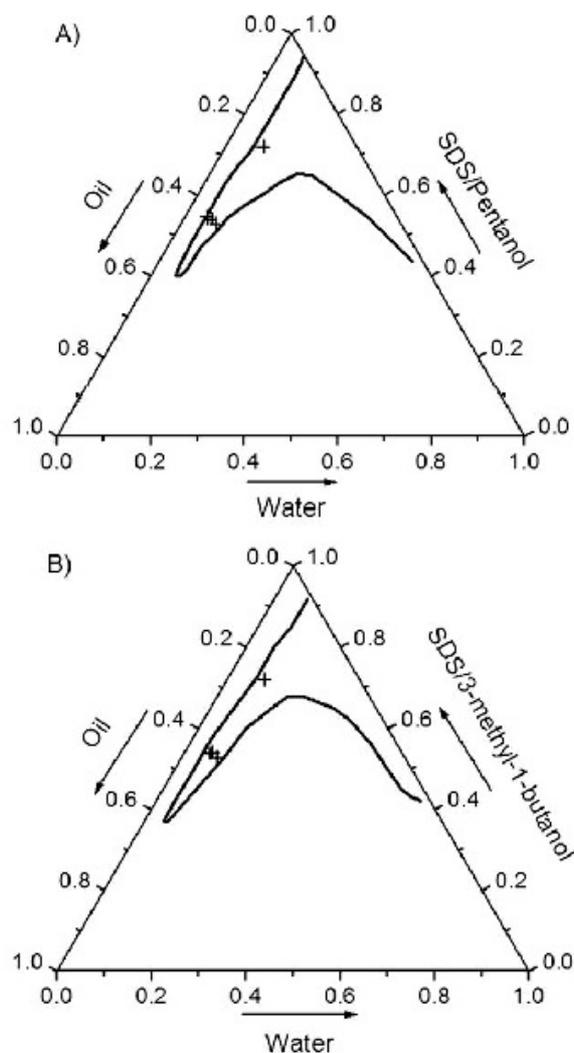
Before DLS measurements, and to minimize the interference of suspended dust particles, the solutions were centrifuged during 30 min at 4000 rpm. The hydrodynamic radii of the droplets were calculated through fitting to one-exponential time correlation functions (Microcal Origin 6.0, Microcal Software, Northampton, UK), and inverse Laplace transformation using CONTIN [31] and REPES programs [32,33]. The latter one has been employed in order

to obtain the size distribution of the ME droplets. SAXS measurements were carried out at 1.608 Å wavelength with a source to detector distance of 732.5 mm. Finally, linear scan voltammetry for oxidation of H<sub>2</sub>O contained into the ME droplets was carried out at a 10 μm radius Pt disk working ultramicroelectrode (ume) using Pt quasi-reference and auxiliary electrodes, under N<sub>2</sub> stream, at room temperature and with a scan rate of 1 mV s<sup>-1</sup>.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Phase diagrams

Water/soybean oil/SDS/co-surfactant pseudo-ternary phase diagrams, with a constant 1:4 SDS/co-surfactant ratio (w/w) were obtained using either 1-pentanol or 3-methyl-1-butanol (Fig. 1). The small area separating the ME (inside) and two-phase (outside) domains is delimited. The present study examined the behavior of low water content and high oil amount MEs composition in order



**Fig. 1.** Pseudo-ternary phase diagrams obtained for water/soybean oil/ (1:4 SDS/co-surfactant) ratio (w/w) at 25 °C, with (A) 1-pentanol and (B) 3-methyl-1-butanol. The small delimited area separates the apparently single-phase of the ME (inside) and two-phase (outside) domains. The compositions of MEs studied in this work are indicated by the x points on the diagrams.

to guarantee increased sensitivity in electroanalytical characterization and chemical analysis of vegetable oils.

Although the phase diagrams for both alcohols are similar, the particle dynamics and electrochemical behaviors of the MEs have shown remarkable differences.

### 3.2. Characterization of MEs containing 40% soybean oil

The charge fluctuation model [34–36] accounts for the electrical conductivity of electroneutral diluted w/o MEs. According to this model, charged aqueous droplets would result from a spontaneous fluctuation in the number of counter ions exchanged with the ionic heads of the surfactant at the w/o interface. Therefore, assuming that the ME behaves as a solvent medium, its electrical conductivity,  $\kappa$ , would result from the migration of charged non-interacting droplets. The  $\kappa$  values would then depend directly on the water droplets volume fraction, temperature and relative electrical permittivity of the medium and inversely on viscosity and droplets size [34].

In order to verify if the systems showed any percolation threshold and to assure adequate conditions to carry out electrochemical experiments, electrical conductivity ( $\kappa$ ) measurements have been performed. Plots of the electrical conductivity natural logarithm ( $\ln \kappa$ ) versus the reciprocal temperature (see Eq. (1)) were obtained for six w/o MEs prepared with ca. 40% soybean oil and 40% co-surfactant (w/w), either 1-pentanol or 3-methyl-1-butanol (1:4 SDS/co-surfactant ratio). According to the Arrhenius law, it can be written:

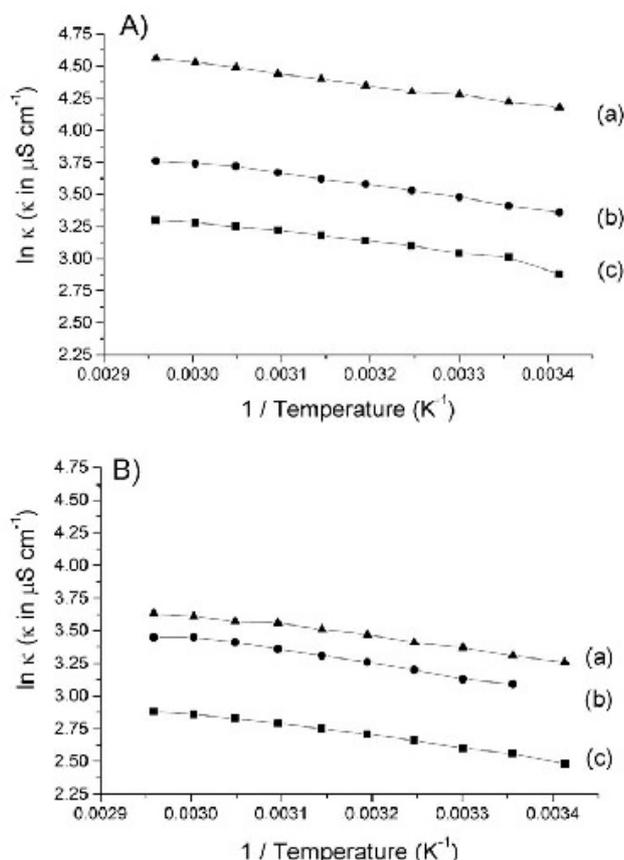
$$\ln \kappa = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (1)$$

where  $A$  is a constant and  $E_a$  the activation energy [37]. As shown in Fig. 2, and in accordance to Eq. (1), the electrical conductivity of the MEs increased both with temperature and water content. Moreover the calculated slopes of the curves ( $-888 \pm 54$ ) were the same. This behavior evidenced that, for all water contents investigated in MEs containing either 1-pentanol or 3-methyl-1-butanol, the same activation energy is required for migration of charged species to occur. On the other hand, as discussed below, significantly lower conductivity values were observed for MEs prepared with 3-methyl-1-butanol than for those prepared using 1-pentanol. Finally, no abrupt conductivity variation has been detected along more than two orders of magnitude thus indicating the absence of any percolation threshold [38–40].

DLS experiments were carried out in w/o MEs containing 40% soybean oil at different temperatures. All time correlation functions were well fitted by a single exponential, the resulting size distributions showing a single narrow peak. The same  $R_H$  values were obtained by applying CONTIN, REPES and single-exponential fitting.

Plots of the relaxation rate versus square-scattering vector (data not given) showed straight lines with zero intercepts evidencing a pure translational mode of the droplets. On the other hand the relaxation time distribution shifted to higher frequencies with increasing temperature, thus meaning that the droplets  $R_H$  has diminished [41]. Since percolation is usually ascribed to the formation of droplet aggregates [38], this behavior evidenced further the lack of a percolation threshold.

Fig. 3 shows the hydrodynamic radius ( $R_H$ ) calculated from the Stokes–Einstein relationship, for 7.5% H<sub>2</sub>O and ca. 40% soybean oil MEs containing either 1-pentanol or 3-methyl-1-butanol. As it can be observed, the  $R_H$  values were practically independent of the scattering angle. Actually, considering the small radii of the droplets (less than 9 nm), this was the expected behavior. On the other hand, at 40 and 60 °C the droplets size, as estimated by the  $R_H$  values, was practically the same either using 1-pentanol or 3-methyl-

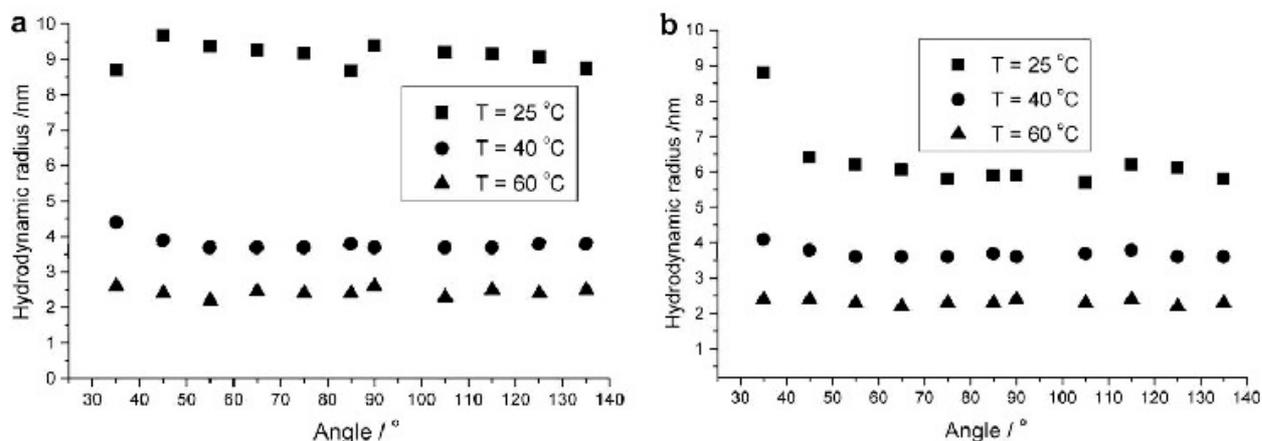


**Fig. 2.** Arrhenius plots of electrical conductivity natural logarithm ( $\ln \kappa$ , in  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) versus the absolute temperature reciprocal (in  $\text{K}^{-1}$ ) for six water/soybean oil/SDS/co-surfactant compositions in percentages (w/w), as follows: above (A) using 1-pentanol: (a) 7.5/39.7/10.7/42.1; (b) 6.0/40.0/10.8/43.2; (c) 5.0/40.5/10.9/43.6. Below (B) using 3-methyl-1-butanol: (a) 7.5/39.7/10.7/42.1; (b) 6.0/40.0/10.8/43.2; (c) 5.5/40.3/10.8/43.3.

1-butanol. On the contrary, at room temperature, the  $R_H$  of the droplets for the ME prepared with 3-methyl-1-butanol was much lower than the one observed using 1-pentanol (see Table 1). As it is further discussed below, this difference should be attributed to the shorter length and wider shape of 3-methyl-1-butanol hydrocarbon chain when compared to 1-pentanol. Owing to these steric differences between both co-surfactants, a more efficient stabilization of the curved hydrophobic–hydrophilic interfacial region is achieved using 3-methyl-1-butanol. Nevertheless, as a consequence of the higher disorder produced by thermal motion, this difference probably vanished at higher temperatures.

Fig. 4 (left) shows the droplet size distributions obtained by REPES for MEs prepared with, respectively, 1-pentanol and 7.5% water or 3-methyl-1-butanol and different water contents, at 25 °C while Fig. 4 (right) displays the results obtained with the latter ME compositions at different temperatures. As it can be observed, the droplet size distributions are rather narrow. The small faster modes appearing in Fig. 4 are artifacts since the related droplet sizes correspond to  $R_H$  around 0.6 nm, a value which is under the uncertainty limit of the DLS technique. The results of similar experiments carried out for a 90° scattering angle, at 25, 40 and 60 °C, in MEs containing either 1-pentanol or 3-methyl-1-butanol, as well as 5.5%, 6.0% or 7.5% H<sub>2</sub>O, are summarized in Table 1.

It can be concluded that, at a given temperature, an increase in water content shifts the droplet size distribution towards higher hydrodynamic radii while for a given water content the hydrody-



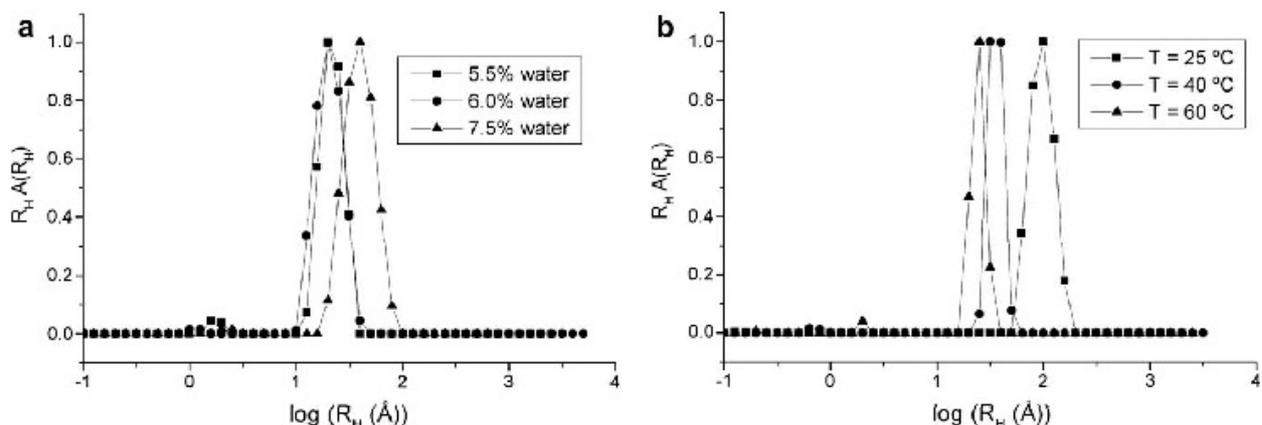
**Fig. 3.** Hydrodynamic radii (nm) versus scattering angle ( $^{\circ}$ ) for MEs containing 7.5% water, 39.7% soybean oil, 10.7% SDS and 42.1% co-surfactant, at the temperatures indicated in the insets using 1-pentanol (left) and 3-methyl-1-butanol (right) as co-surfactants.

**Table 1**

Average hydrodynamic radii ( $R_H$ ) at different temperatures and water contents for w/o MEs prepared with soybean oil, water, SDS and either 1-pentanol or 3-methyl-1-butanol.

Alcohol	Water/soybean oil/SDS/alcohol (%)	$R_H \pm s$ (nm) <sup>a</sup>		
		$T = 25$ °C	$T = 40$ °C	$T = 60$ °C
1-Pentanol	5.0/40.5/10.9/43.6	$2.4 \pm 0.2$	$1.8 \pm 0.2$	$1.3 \pm 0.1$
1-Pentanol	6.0/40.0/10.8/43.2	$4.3 \pm 0.2$	$2.7 \pm 0.2$	$1.9 \pm 0.2$
1-Pentanol	7.5/39.7/10.7/42.1	$9.1 \pm 0.3$	$3.8 \pm 0.2$	$2.4 \pm 0.1$
3-Methyl-1-butanol	5.5/40.3/10.8/43.3	$2.7 \pm 0.3$	$2.2 \pm 0.2$	$1.6 \pm 0.2$
3-Methyl-1-butanol	6.0/40.0/10.8/43.2	$3.2 \pm 0.1$	$2.2 \pm 0.2$	$1.7 \pm 0.2$
3-Methyl-1-butanol	7.5/39.7/10.7/42.1	$6.2 \pm 0.8$	$3.7 \pm 0.2$	$2.3 \pm 0.1$

<sup>a</sup> Standard deviations,  $s$ , calculated from three DLS measurements replicates.



**Fig. 4.** Normalized distributions of the droplet size for w/o ME measured at  $90^{\circ}$  scattering angle. Left: ME prepared with 3-methyl-1-butanol, the  $H_2O$  content of which is indicated in the inset, at  $40$  °C. Right: ME prepared with 1-pentanol and 7.5% water at the temperatures indicated in the inset.

dynamic radii decrease with increasing temperature. This behavior is possibly due, simultaneously, to the net charge and faster motion of the droplets, together with a higher probability of collisions.

Moreover, at  $25$  °C, MEs prepared with 3-methyl-1-butanol containing 6.0% and 7.5% water presented smaller  $R_H$  values than those found for MEs prepared with 1-pentanol with the same water content. As deduced from the relative permittivity (see data below), the difference in polarity between both alcohols is negligible, so that the difference between their  $R_H$  values should be ascribed to a steric effect in the barrier between the continuous

and dispersed pseudo-phases. In relation to 1-pentanol, 3-methyl-1-butanol is probably better suited to stabilize the curved surfaces of the aqueous droplets due to the shorter and wider shape of its branched hydrocarbon chain. Besides, the vanishing of this effect at higher temperatures was probably the result of the droplets thermal motion with a subsequent higher disorder within the barrier region. However, since the experimental values of  $R_H$  at  $40$  and  $60$  °C were of the same magnitude order as the DLS uncertainty limit (see Table 1), steric effects with increasing temperature have not been unambiguously evidenced.

### 3.3. Electrochemical behavior of MEs containing 40% soybean oil

Anodic voltammograms of MEs prepared with ca. 40% soybean oil and different water percentages are shown in Fig. 5. For higher water contents it has been observed that oxidation of the water contained into the ME droplets takes place at less positive half-wave potentials ( $E_{1/2}$ ) and that the limiting current ( $i_{lim}$ ) increases proportionally to the water content. Besides, higher limiting current and lower ohmic drop values have been evidenced for the MEs prepared with 1-pentanol, as compared to those obtained when using 3-methyl-1-butanol, in accordance with the electrical conductivity results (see Fig. 2).

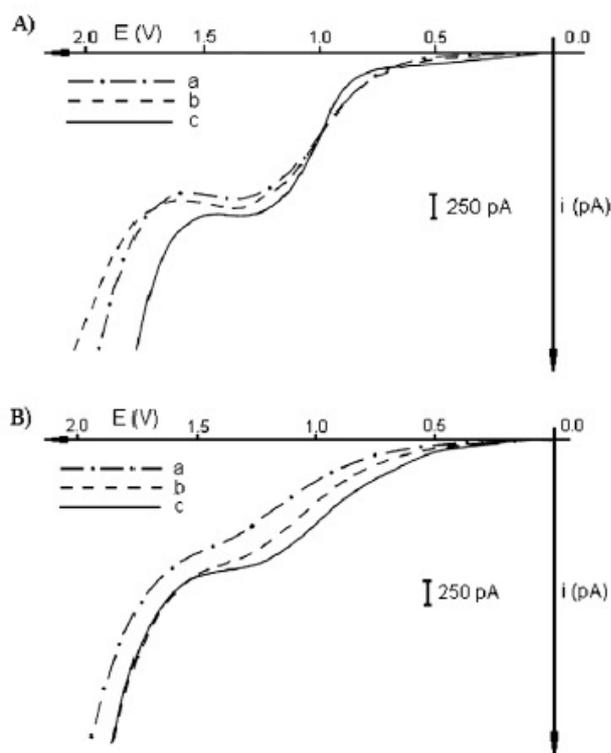
The profiles of the voltammetric curves in Fig. 5 (below) evidenced a slower charge transfer reaction kinetics for the MEs prepared with 3-methyl-1-butanol, which agrees with the lower electrical conductivity obtained for MEs containing this alcohol (see Fig. 2).

The electrochemical diffusion coefficient of the water droplets has been calculated from the limiting current expression for small sized electrodes (ultramicroelectrodes) [42]:

$$i_{lim} = 4nFrDC \quad (2)$$

where  $n$  is the redox system number of electrons,  $F$  the Faraday constant,  $r$  the radius of the Pt disk (1  $\mu\text{m}$ ),  $C$  the molar concentration of the electroactive species (water in the droplets) and  $D$  the electrochemical diffusion coefficient of the droplets.

The  $D$  values magnitude order for water droplets calculated from Eq. (2) was  $10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  and decreased slightly with the increasing water content in the MEs, in accordance with the



**Fig. 5.** Voltammograms of w/o MEs prepared with (A) 1-pentanol (above) and (B) 3-methyl-1-butanol (below) as co-surfactants for water/soybean oil/SDS/alcohol ME compositions in percentages (w/w) containing, respectively, 1-pentanol, above (a) 5.0/40.5/10.9/43.6; (b) 6.0/40.0/10.8/43.2; (c) 7.5/39.7/10.7/42.1 and 3-methyl-1-butanol, below (a) 5.5/40.3/10.8/43.3; (b) 6.0/40.0/10.8/43.2; (c) 7.5/39.7/10.7/42.1. Working Pt ume with 1  $\mu\text{m}$  radius versus Pt quasi-reference electrode. Scanning rate 1  $\text{mV s}^{-1}$ .

increased droplets size with the water content (see Table 1 and Fig. 3). However, for all MEs in the present study, the values of the diffusion coefficient calculated from electrochemical data were lower than those obtained by DLS (see Table 2).

As previously stated [27], this apparent discrepancy evidenced that water oxidation in the MEs requires the transport of the  $\text{H}_2\text{O}$  molecules from inside the droplets to the electrode surface for the charge transfer reaction to occur. Moreover, this process is probably concomitantly hindered by the barrier around the droplets and by an unfavorable migration process resulting from the positively charged water droplets, according to the charge fluctuation model [34–36].

At room temperature, the droplets seem to move faster in MEs prepared with 3-methyl-1-butanol ( $R_H = 6.2 \text{ nm}$ ) than in those prepared with 1-pentanol ( $R_H = 9.1 \text{ nm}$ ). In fact, the former system showed higher translational diffusion coefficient values as determined by DLS ( $D_{w/o}^{\text{DLS}} = 2.9 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). On the contrary, the diffusion coefficient calculated from electrochemical measurements,  $D_{w/o}^{\text{EC}}$ , was higher for MEs prepared with 1-pentanol (see Table 2) than for those prepared with 3-methyl-1-butanol. Further, for both co-surfactants, the  $D_{w/o}^{\text{DLS}}$  values were higher than those obtained from electrochemical measurements,  $D_{w/o}^{\text{EC}}$ , thus confirming an unfavorable migration process towards the anode.

Considering that the distribution of the counter ions inside the droplets depends on the ionization of the surfactant, which is influenced by the nature and concentration of the co-surfactant [35], the lower  $D_{w/o}^{\text{EC}}$  value for the MEs prepared with 3-methyl-1-butanol may be due to its lower relative permittivity and to a diminished number of charged water droplets arriving to the electrode surface, thus decreasing the water oxidation rate.

Data in Table 2 have shown additionally that the  $D_{w/o}^{\text{DLS}}/D_{w/o}^{\text{EC}}$  ratio is 1.9 for 1-pentanol, and 4.1 for 3-methyl-1-butanol, which confirms the formation of smaller droplets with the latter co-surfactant, at 25  $^\circ\text{C}$ .

Therefore, the experimental conditions required to develop electroanalytical determinations in w/o MEs containing up to 40% soybean oil, especially for electroactive water soluble compounds, can be conveniently established by the combined use of electrochemical and DLS measurements. Therefore, information that would not be evidenced by one of these two techniques only, can be provided by using them jointly.

### 3.4. Characterization of MEs containing 20% soybean oil by electrical conductivity and SAXS

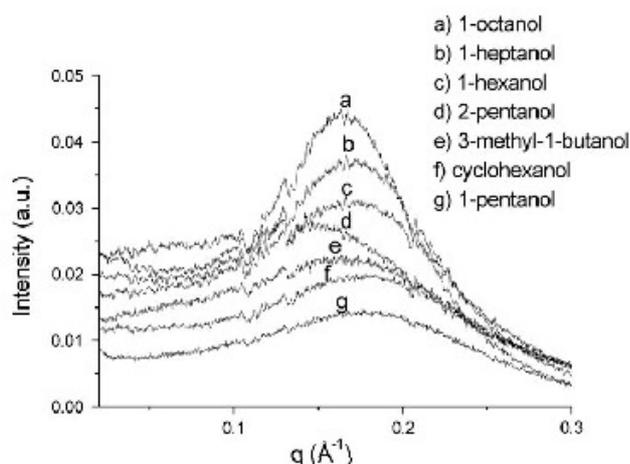
For some of the w/o ME compositions studied, the magnitude of the hydrodynamic radii ( $R_H$ ) is under 3 nm which is below the particle size magnitude detectable with reliability by DLS. To surmount this difficulty, SAXS measurements have been carried out. On the other hand, in order to investigate the influence of the alcohol structure on the physicochemical properties and electrochemical behavior of these systems, the same measurements have been performed using different carbon chain length co-surfactants.

Nevertheless, to enable ME formation using as co-surfactant either 1-pentanol, 2-pentanol, 3-methyl-1-butanol, 1-hexanol, 1-heptanol, 1-octanol or cyclohexanol, the soybean oil content had

**Table 2**

Electrochemical,  $D_{w/o}^{\text{EC}}$ , and translational,  $D_{w/o}^{\text{DLS}}$ , diffusion coefficients at 25  $^\circ\text{C}$ , obtained from electrochemical and DLS measurements for MEs containing 7.5% water, 39.7% soybean oil, 10.7% SDS and 42.1% of either 1-pentanol or 3-methyl-1-butanol.

Co-surfactant	$D_{w/o}^{\text{EC}}$ ( $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ )	$D_{w/o}^{\text{DLS}}$ ( $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ )
1-Pentanol	$1.1 \times 10^{-12}$	$2.1 \times 10^{-12}$
3-Methyl-1-butanol	$0.7 \times 10^{-12}$	$2.9 \times 10^{-12}$



**Fig. 6.** Intensity versus scattering vector ( $q$ ) for SAXS measurements in w/o MEs prepared with 8.0% water, 20.0% soybean oil, 14.2% SDS and 57.8% co-surfactants, as indicated in the inset.

to be lowered from 40% to 20%. Even so, MEs formation was not observed when either ethanol, 2-propanol, 2-methyl-1-propanol, 3-ethyl-1-heptanol, 1-decanol, ethanediol or diethylene glycol were used as co-surfactants. The relative scattering intensity data for the MEs have been plotted as a function of the magnitude of the scattering vector,  $q = 4\pi(\sin\theta)/\lambda$  where  $2\theta$  and  $\lambda$  are the scattering angle and X-ray wavelength, respectively. As shown in Fig. 6 and Table 3, the geometric radius of the droplets was obtained by SAXS. This radius corresponds to the half value of a characteristic correlation dimension  $d$  calculated by  $d = 2\pi/q^*$  where  $q^*$  is the maximum value of the SAXS peaks. As it can be seen in Fig. 6, some of the peaks are broad and show low intensity. This may be due to a low electron density contrast between the particle and the medium [43], which is expected to change when the alcohol chain length increases. As seen in Table 3, the solubility in water from 1-pentanol to 1-octanol decreases by increasing the length of the carbon chain. Considering the higher amount of alcohol in MEs containing 20% soybean oil, only a fraction of the co-surfactant should be located in the dispersed phase (droplet shell and/or core), the major part being presumably in the continuous phase. Taking into account the MEs prepared with, respectively, 1-octanol and 1-pentanol, the former alcohol being insoluble in water, it probably will not be able to penetrate into the water core of the droplet, a higher electron density contrast being expected than for 1-pentanol, thus leading to a narrower, higher intensity and better defined SAXS peak, in comparison to the one for 1-pentanol.

According to data in Table 3, the electrical conductivity of the MEs decreased when the length of the linear hydrocarbon chain of the co-surfactant increased from 1-pentanol to 1-octanol. On the other hand  $R_H$ ,  $R$  and the alcohol viscosity increased, which may account for the diminished conductivity values, in agreement with the equation proposed by Eicke [34]. A similar conclusion was

been reported by Lindman and coworkers [44]. The co-surfactant 3-methyl-1-butanol did not stand for the rule, which could be attributed to the major influence of steric effects.

By using 2-pentanol as co-surfactant, the ME conductivity was around two times lower than the one obtained using 1-pentanol. Again, this could be due to the lower electrical permittivity of 2-pentanol, to its higher solubility in water when compared to 1-pentanol, as well as to the higher geometric radii of the droplets, which is probably due to a steric effect in the droplet barrier layer, similar to the one observed for 3-methyl-1-butanol (see above). On the other hand, MEs prepared with 2-pentanol showed slightly lower viscosity values than those prepared with 1-pentanol but the difference is too small to explain the much larger drop in electrical conductivity of the latter.

Reported results for several surfactants [45–47], have evidenced that their ionization degree in the aqueous pseudo-phase changes by adding an alcohol. This may occur with SDS, leading to a smaller number of charged droplets in the MEs prepared with other alcohols as compared to those prepared with 1-pentanol. However, steric effects may also contribute to the observed conductivity drop.

The conductivity of the MEs prepared with 1-hexanol and cyclohexanol differed remarkably. In spite of the very high viscosity of cyclohexanol, the conductivity of the ME prepared with this co-surfactant was rather high ( $91.0 \mu\text{S cm}^{-1}$ ). This large value was probably due to the higher relative permittivity of cyclohexanol, 16.4 (see Table 3) although percolation of the water pseudo-phase through the continuous pseudo-phase could also increase the ME conductivity.

Using SAXS, the same  $R$  values were found for the MEs prepared with either 3-methyl-1-butanol or 1-hexanol, whereas electrical conductivity values were quite different. These results suggest that, in addition to the droplet radius, the relative electrical permittivity, viscosity and degree of ionization of the surfactant in the hydro-organic medium contained into the droplets should be considered to interpret ME conductivities.

For w/o MEs with 20% soybean oil, the electrical conductivity behavior can be partially explained in light of the equation proposed by Eicke to calculate the charge density of the particles [34]. The electrical conductivity of MEs has also shown to be dependent on the co-surfactant solubility in water and, probably, on the surfactant degree of ionization.

Data in Tables 1 and 3 allow comparing the droplet  $R_H$  values in the MEs prepared with either 1-pentanol or 3-methyl-1-butanol, for two soybean oil concentrations (40% and 20%). They correspond also to two different soybean oil to co-surfactant ratios, namely, 1:1 (Table 1, with ca. 40% of each) and 1:3 (Table 3, with 20% soybean oil and 58% alcohol).

It can be observed that, at 25 °C, the  $R_H$  values were significantly higher for the MEs having higher soybean oil and lower co-surfactant concentrations (9.1 nm for 1-pentanol and 6.2 nm for 3-methyl-1-butanol). Since very low concentrations of water are present in the continuous pseudo-phase, these higher  $R_H$  values may be due to an increase in the number of water molecules into

**Table 3**  
Parameters at 25 °C for MEs prepared with 8.0% water, 20.0% soybean oil, 14.2% SDS and 57.8% alcohol at a 1:4 SDS/co-surfactant ratio (w/w).<sup>a</sup>

Co-surfactant	ME				Alcohol			
	$R_H$ (nm)	$R$ (nm)	$\kappa$ ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	$\eta$ (cP)	$\eta_a$ (cP) [48]	$s_w$ ( $\text{g L}^{-1}$ ) [48]	$\epsilon$ [49]	
1-Pentanol	1.9	1.6	93.8	9.8	3.62	27	15.1	
2-Pentanol	1.2	1.9	53.0	9.1	3.47	135	13.7	
3-Methyl-1-butanol	1.9	1.7	73.5	10.3	3.69	25	14.7	
1-Hexanol	1.7	1.7	35.1	11.8	4.58	5.8	13.0	
Cyclohexanol	1.0	1.6	91.0	35.1	57.5	40	16.4	
1-Heptanol	2.1	1.7	15.5	16.6	5.81	1	11.7	
1-Octanol	2.6	1.8	6.4	23.8	7.29	Not soluble	10.3	

<sup>a</sup>  $R_H$ , hydrodynamic radius;  $R$ , geometric radius;  $\kappa$ , electrical conductivity;  $\eta$  and  $\eta_a$ , viscosity;  $s_w$ , solubility in water;  $\epsilon$ , relative permittivity.

the droplets, the stability of which requires, as compared to soybean oil poor MEs, a lower total surfactant plus co-surfactant percent.

Therefore, concerning the development of electroanalytical procedures for the chemical characterization of vegetable oils, 1-pentanol is more advantageous as co-surfactant than the other short-chain alcohols investigated due to the superior conductivity imparted to the corresponding MEs.

#### 4. Summary

This study has brought elucidating insights into fundamental water-in-oil microemulsion knowledge. The importance of the co-surfactant nature on the interface water/oil has been demonstrated, especially the role of its hydrocarbon chain length and structure as the most significant parameters governing the physicochemical properties of these systems.

In spite of their phase diagrams similarity, the w/o MEs prepared with water, soybean oil, SDS, and either 1-pentanol or 3-methyl-1-butanol as co-surfactant have shown remarkable differences when examined by electrical conductivity, DLS and linear voltammetry measurements. For soybean oil rich MEs, the hydrodynamic radius of the water droplets,  $R_H$ , diminished with increasing temperatures and increased with the water content together with the electrical conductivity. Aggregation of the droplets and subsequent percolation has not been observed for any of the studied MEs. Since the polarities of 3-methyl-1-butanol and 1-pentanol are quite the same, the difference in droplets size has been attributed to steric effects. Thus, the wider shape of the branched hydrocarbon chain of 3-methyl-1-butanol is probably better suited than the linear chain of 1-pentanol to stabilize the curved surfaces of the barrier regions between the continuous and dispersed pseudo-phases.

Significantly higher  $R_H$  values have been found for MEs prepared with higher soybean oil and lower co-surfactant concentrations. Since a very low water content may be present in the continuous pseudo-phase, an increase in the number of water molecules into the droplets is to be expected.

Concerning the development of electroanalytical procedures in the proposed media applied to the quality control of soybean oil, the use of 1-pentanol as co-surfactant seems to be more advantageous than 3-methyl-1-butanol, due to the higher conductivity imparted to the resulting w/o MEs.

Finally, MEs features that would not be observed by the independent use of electrochemical, DLS and SAXS data, were evidenced by the joint use of these techniques.

#### Acknowledgments

The authors thank the support of CAPES, LNLS, CNPq, and Project CTQ2007-61445/BQU (MEC of Spain and FEDER funds).

#### References

- [1] A. Baars, K. Aoki, J. Watanabe, *J. Electroanal. Chem.* 464 (1999) 128.

- [2] R.M. Whightman, D.O. Wipf, in: A.J. Bard (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, vol. 15, Marcel Dekker, New York, 1989, p. 267.
- [3] C. Ceballos, H. Fernández, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 731.
- [4] J. Gao, C.K. Njue, J.K.N. Mbindyo, J.F. Rusling, *J. Electroanal. Chem.* 464 (1999) 31.
- [5] J. Sjöblom, R. Lindberg, S.E. Friberg, *Adv. Colloid Interface Sci.* 65 (1996) 125.
- [6] H. Watarai, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 93.
- [7] S. Ezrahi, E. Tuval, A. Aserin, N. Garti, *J. Colloid Interface Sci.* 291 (2005) 263.
- [8] R. Guo, X. Wei, T. Liu, W. Liu, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 277 (2006) 59.
- [9] M. Broderick, S. Donegan, J. Power, K. Altria, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 877.
- [10] J.S. Yuan, M. Ansari, M. Samaan, E.J. Acosta, *Int. J. Pharm.* 349 (2008) 30.
- [11] M. Kahlweit, R. Strey, D. Haase, H. Kunieda, et al., *J. Colloid Interface Sci.* 118 (1987) 436.
- [12] K.M. Rajib, K.P. Bidyut, *J. Colloid Interface Sci.* 283 (2005) 565.
- [13] A.K. Giannakas, G.S. Ladavos, D.E. Armatas, et al., *Appl. Surf. Sci.* 252 (2006) 2159.
- [14] M.A. Polizelli, V.R.N. Telis, L.Q. Amaral, E. Feitosa, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 281 (2006) 230.
- [15] J.S. Esteve-Romero, E.F. Simó-Alfonso, M.C.G. Alvarez-Coque, G. Ramis-Ramos, *Anal. Chim. Acta* 235 (1990) 317.
- [16] J.F. Noguera-Ortí, R.M. Villanueva-Camañas, G. Ramis-Ramos, *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 127.
- [17] C.R.B. Mendonça, C.I.D. Bica, C.M.S. Piatnicki, E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, *Electrophoresis* 26 (2005) 858.
- [18] C.R.B. Mendonça, C.I.D. Bica, E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, C.M.S. Piatnicki, *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (2008) 775.
- [19] A. Jesus, M.M. Silva, M.G.R. Vale, *Talanta* 74 (2008) 1378.
- [20] H. Dave, F. Gao, M. Schultz, C.C. Co, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 296 (2007) 45.
- [21] J. Flanagan, K. Kortegaar, D.N. Pinder, T. Rades, H. Singh, *Food Hydrocolloids* 20 (2006) 253.
- [22] M.A. Polizelli, A.L. Santos, E. Feitosa, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 315 (2008) 130.
- [23] T.N.C. Dantas, A.C. da Silva, A.A.D. Neto, *Fuel* 80 (2001) 75.
- [24] A. Demirbas, *Prog. Energy Combust. Sci.* 31 (2005) 466.
- [25] A. Lif, K. Holmberg, *Adv. Colloid Interface Sci.* 123–126 (2006) 231.
- [26] K. Zielińska, K.A. Wilk, A. Jezierski, T. Jesionowski, *J. Colloid Interface Sci.* 321 (2008) 408.
- [27] C.R.B. Mendonça, C.I.D. Bica, C.M.S. Piatnicki, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 628.
- [28] A. Kogan, N. Garti, *Adv. Colloid Interface Sci.* 123–126 (2006) 369.
- [29] M.J. Schwuger, K. Stckdorn, R. Schomäcker, *Chem. Rev.* 95 (1995) 849.
- [30] T. Hellweg, W. Eimer, *Colloids Surf. A* 136 (1998) 97.
- [31] S.W. Provencher, *Macromol. Chem.* 180 (1979) 201.
- [32] J. Jakes, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 60 (1995) 1781.
- [33] K. Schillen, W. Brown, R.M. Johnsen, *Macromolecules* 27 (1994) 4825.
- [34] H.F. Eicke, M. Borkovec, B. Das-Gupta, *J. Phys. Chem.* 93 (1989) 314.
- [35] D.G. Hall, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 429.
- [36] H.Y. Pan, *Chem. Phys. Lett.* 185 (1991) 344.
- [37] P.W. Atkins, *Physical Chemistry*, sixth ed., Oxford University Press, Oxford, 1998.
- [38] N. Kozlovich, A. Puzenko, Y. Alexandrov, Y. Feldman, *Colloids Surf. A* 140 (1998) 299.
- [39] E. Alvarez, L. García-Río, J.C. Mejuto, J.M. Navaza, J. Pérez-Juste, *J. Chem. Eng. Data* 44 (1999) 846.
- [40] Y. Hattori, H. Ushiki, W. Engl, L. Courbin, P. Panizza, *Physica A* 353 (2005) 29.
- [41] C.R.B. Mendonça, *Desenvolvimento de metodologias para análise direta de óleo vegetais empregando microemulsões de água em óleo e meios não aquosos*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Tese de doutorado), 2005.
- [42] H.B. Oldham, J.C. Myland, *Fundamentals of Electrochemical Science*, Academic Press, San Diego, 1994.
- [43] N. Dingenouts, J. Bolze, D. Potsche, M. Ballauf, *Adv. Polym. Sci.* 144 (1999) 1.
- [44] P. Stilbs, K. Rapacki, B. Lindman, *J. Colloid Interface Sci.* 95 (1983) 583.
- [45] M.A. Hamdy, L.B. Al-Mansour, *J. Phys. Chem.* 83 (1979) 2236.
- [46] J.W. Larsen, L.B. Tepley, *J. Colloid Interface Sci.* 49 (1974) 113.
- [47] B.S. Miyagishi, *Chem. Soc. Jpn.* 48 (1975) 2349.
- [48] D.R. Lide (Ed.), *Handbook of Chemistry and Physics*, 78th ed., CRC Press, Boca Raton, 1997.
- [49] S. Budavari (Ed.), *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemical, Drugs, and Biological*, 12th ed., Merck & Co. Inc., New Jersey, 1996.



the society for solid-state  
and electrochemical science  
and technology

**The Electrochemical Society**

65 South Main Street  
Building D  
Pennington, New Jersey  
08534-2839  
USA

tel 609 737 1902  
fax 609 737 2743

[www.electrochem.org](http://www.electrochem.org)

November 1, 2006

To Whom It May Concern:

This is to certify that Clarisse Maria S. Piatnicki (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), presented a paper titled Influence of the Co-Surfactant in the Electrical Conductivity of W/O Microemulsions at the 2006 Joint International Meeting held in Cancun, Mexico October 29 through November 3, 2006. This poster was co-authored by C. Medonça (Universidade Federal de Pelotas), Y. da Silva, W. Böckel and C. Bica (Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

Sincerely,

Roque J. Calvo  
Executive Director

## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **DETERMINAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE ÁCIDOS GRAXOS EM ÓLEO VEGETAL** de autoria de **Carla R.B. Mendonça, Yara P. da Silva, Wolmir Böckel, Clara I.D. Bica, Clarisse M.S. Piatnicki** foi apresentado na forma oral durante o XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - Paraná 2005, realizado pela Universidade Estadual de Londrina, em Londrina, PR, no período de 04 a 07 de dezembro de 2005.

Londrina, 04 de dezembro de 2005.



**Luiz Henrique Dall'Antonia**  
Coordenador do XV SIBEE



**Jair Scarmínio**  
Vice-Coordenador do XV SIBEE

**Salão de Iniciação Científica**

**Feira de Iniciação Científica**

**Salão UFRGS Jovem**

**CERTIFICADO**

**Certificamos que o trabalho**  
**REATIVIDADE DO BIODIESEL E SUAS MISTURAS EM PRESENÇA DE AÇO CARBONO 1020**

**de autoria de**

**EDILENE SZIMANSKI AUZANI**

**YARA PATRICIA DA SILVA, ARIANE VANESSA ZMOZINSKI, WOLMIR JOSÉ BÖCKEL**

**tendo como orientador**

**CLARISSE MARIA SARTORI PIATNICKI**

**foi apresentado na Sessão ELETROQUÍMICA**

**no XX Salão de Iniciação Científica, promovido pela Pró-Reitoria de Pesquisa – PROPESQ na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 20 a 24 de Outubro de 2008.**

Porto Alegre, outubro de 2008.

  
João Edgar Schmidt  
Pró-Reitor de Pesquisa

LET 11.2011.010

# CERTIFICADO

XVIII Salão de Iniciação Científica  
XV Feira de Iniciação Científica  
I Salão UFRGS Jovem

## Certificamos que o trabalho

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO CO-SURFACTANTE NA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE MICROEMULSÕES

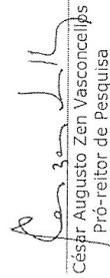
### de autoria de

TAVARA MAGALHÃES CAMPOS  
WOLMIR J BOCKEL  
CARLA R B MENDONÇA  
EMILSE M A MARTINI

tendo como orientador(a): CLARISSE MARIA SARTORI PIATNICKI  
foi apresentado na Sessão: Eletroquímica

no XVIII Salão de Iniciação Científica, promovido pela Pró-Reitoria de Pesquisa - PROPESQ,  
na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 15 a 20 de outubro de 2006.

Porto Alegre, outubro de 2006



César Augusto Zen Vasconcellos  
Pró-reitor de Pesquisa



pro:pesq



## II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de **Biodiesel**

Certificamos que, YARA PATRÍCIA SILVA, WOLMIR JOSÉ BÖCKEL, CARLA ROSANE BARBOSA MENDONÇA, CLARA ISMÉRIA BICA, CLARISSA MARIA SARTORI PIATNICKI apresentaram o trabalho “Formação e caracterização de microemulsões de biodiesel” no “II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel”, realizado em Brasília – DF, nos dias 27, 28 e 29 de novembro de 2007.



**Guilherme Henrique Pereira**

Secretário de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação do MCT



**Lynaldo Cavalcanti de Albuquerque**

Secretário Executivo da ABIPTI



Realização

**abipti**

ASSOCIAÇÃO DAS  
INSTITUIÇÕES DE PESQUISA

Minis-  
Ciência e Tec

**BRA**  
UM PAÍS DE  
GOVERNO FE

# CERTIFICADO

XVIII Salão de Iniciação Científica  
XV Feira de Iniciação Científica  
I Salão UFRGS Jovem

## Certificamos que o trabalho

INFLUÊNCIA DO CO-SURFACTANTE NA ESTRUTURA DE MICROEMULSÕES DE ÁGUA EM ÓLEO DE SOJA

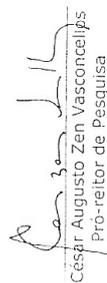
## de autoria de

YARA PATRICIA DA SILVA  
WOLMIR J BÖCKEL  
CARLA R B MENDONÇA  
CLARA I D BICA

tendo como orientador(a): CLARISSE MARIA SARTORI PIATNICKI  
foi apresentado na Sessão: Oleoquímica

no XVIII Salão de Iniciação Científica, promovido pela Pró-Reitoria de Pesquisa - PROPESQ,  
na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 15 a 20 de outubro de 2006.

Porto Alegre, outubro de 2006



César Augusto Zen Vasconcelos  
Pró-reitor de Pesquisa

 **UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL



pro:pesq