



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

GUSTAVO GIRALDI SHIMAMOTO

**MÉTODOS PARA SIMPLIFICAR A CARACTERIZAÇÃO E PARA DETERMINAR
PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÓLEO VEGETAL, DE BIODIESEL E DE
BLENDAS DIESEL-BIODIESEL**

CAMPINAS

2017

GUSTAVO GIRALDI SHIMAMOTO

**MÉTODOS PARA SIMPLIFICAR A CARACTERIZAÇÃO E PARA DETERMINAR
PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÓLEO VEGETAL, DE BIODIESEL E DE
BLENDAS DIESEL-BIODIESEL**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutor em Ciências.**

Orientador: Prof. Dr. Matthieu Tubino

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELO ALUNO GUSTAVO GIRALDI SHIMAMOTO, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MATTHIEU TUBINO.**

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1176-2636>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

Shimamoto, Gustavo Giraldi, 1987-
S162m Métodos para simplificar a caracterização e para determinar parâmetros de qualidade de óleo vegetal, de biodiesel e de blenda diesel-biodiesel / Gustavo Giraldi Shimamoto. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Matthieu Tubino.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Biodiesel. 2. Caracterização. 3. Qualidade. 4. Ressonância magnética nuclear. I. Tubino, Matthieu. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Methods to simplify the characterization and to determine quality parameters of vegetable oil, biodiesel and diesel-biodiesel blend

Palavras-chave em inglês:

Biodiesel

Characterization

Quality

Nuclear magnetic resonance

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Matthieu Tubino [Orientador]

Solange Cadore

José de Alencar Simoni

Eva Lúcia Cardoso Silveira

Claudete Bernardo Henriques

Data de defesa: 12-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Matthieu Tubino (Orientador)

Profa. Dra. Eva Lúcia Cardoso Silveira (DQ-UFMT)

Dra. Claudete Bernardo Henriques (REPLAN-PETROBRAS)

Profa. Dra. Solange Cadore (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. José de Alencar Simoni (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo aluno **GUSTAVO GIRALDI SHIMAMOTO**, aprovada pela Comissão Julgadora em 12 de julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente aos meus pais e meu irmão por acreditarem em meu potencial e por todo apoio.

Ao Prof. Dr. Matthieu Tubino, pela confiança, apoio, incentivo e por todo conhecimento compartilhado que contribuiu muito para meu amadurecimento pessoal, acadêmico e profissional.

A todos os membros do Grupo de Pesquisa em Química Analítica e Educação (GPQuAE), pelas sugestões, críticas e apoio durante o desenvolvimento do trabalho, especialmente à Acacia, ao Luis Francisco, à Patrícia e ao Willian.

À Profa. Dra. Solange Cadore e ao Prof. Dr. José de Alencar Simoni pelas valiosas sugestões e contribuições relacionadas ao trabalho. Aos membros externos da banca examinadora Profa. Dra. Eva Lúcia Cardoso Silveira, Dra. Claudete Bernardo Henriques e Prof. Dr. Luiz Henrique Ferreira.

A todos os funcionários das Salas de Instrumentos Científicos do IQ-UNICAMP, especialmente ao Anderson, à Claudia, à Raquel e à Sonia.

Aos membros da Diretoria, da Comissão de Pós-Graduação e do Departamento de Química Analítica do IQ-UNICAMP.

Às amigas Hipassia e Thais que encontrei na UNICAMP e que me acompanharam desde a graduação até o doutorado, pelo apoio, amizade, convivência e momentos de descontração. Ao João, por todo incentivo, apoio e auxílio com a formatação das figuras relacionadas ao trabalho. Aos amigos Augusto, Julio, Luiz, Daniel e Victor que convivem comigo principalmente nos finais de semana.

OBRIGADO!

RESUMO

“MÉTODOS PARA SIMPLIFICAR A CARACTERIZAÇÃO E PARA DETERMINAR PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÓLEO VEGETAL, DE BIODIESEL E DE BLENDAS DIESEL-BIODIESEL”

O biodiesel é uma mistura de alquil ésteres de cadeia linear, obtida tradicionalmente a partir de óleo vegetal ou gordura animal. Com a finalidade de garantir a qualidade deste biocombustível, foi indispensável o estabelecimento de padrões de qualidade. Portanto, para um biodiesel ser considerado adequado para comercialização, é necessário determinar diversas propriedades e quantificar as concentrações de várias impurezas. Evidentemente, os resultados devem estar dentro de faixas de limites aceitáveis. Assim, considerando o elevado número de análises impostas pelos órgãos de fiscalização, bem como os inconvenientes decorrentes do uso de solventes tóxicos e a geração de resíduos, no presente trabalho são propostos métodos com o objetivo de simplificar a determinação de parâmetros de qualidade de óleo vegetal, de biodiesel e de blends diesel-biodiesel. Nesse contexto, a utilização das técnicas de espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), na região do infravermelho (IV) médio e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) trouxe os seguintes resultados: **1)** modelos de calibração multivariada, a partir de espectros de IV e de RMN ^1H aliados à calibração por mínimos quadrados parciais, para uma análise “*screening*” referente à determinação simultânea de seis importantes parâmetros de óleo vegetal e de biodiesel (massa específica a 20 °C, viscosidade cinemática a 40 °C, índice de iodo, índice de acidez, período de indução e teor de água); **2)** adequação das técnicas de IV e de RMN ^1H e do método de Wijs para o acompanhamento das reações de degradação de óleo vegetal e de biodiesel; **3)** desenvolvimento de dois métodos alternativos para a quantificação de metanol em biodiesel, utilizando a técnica de RMN ^1H e os métodos de adição de padrão e do padrão interno; **4)** desenvolvimento de dois métodos alternativos para a quantificação de biodiesel em blends diesel-biodiesel, sendo um a partir de UV-Vis e o outro por RMN ^1H .

ABSTRACT

“METHODS TO SIMPLIFY THE CHARACTERIZATION AND TO DETERMINE QUALITY PARAMETERS OF VEGETABLE OIL, BIODIESEL AND DIESEL-BIODIESEL BLEND”

Biodiesel is a mixture of straight chain alkyl esters, traditionally obtained from vegetable oil or animal fat. In order to guarantee biodiesel quality, it was essential to establish quality standards. Then, biodiesel can be considered suitable for commercialization, only if the determinations of several properties and impurities are performed and the results are in agreement with the acceptable limits. In this context, considering the large number of analyses, as well as the disadvantages of the use of toxic solvents and waste generation, this work proposes methods to simplify the characterization and to determine quality parameters of vegetable oil, biodiesel and diesel-biodiesel blend. Thus, the use of ultraviolet-visible (UV-Vis), infrared (IR) and hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy techniques yielded the following results: **1)** multivariate calibration models, using IR and ^1H NMR spectra allied to partial least squares calibration, in order to perform a screening analysis of six important quality parameters of vegetable oil and biodiesel (specific mass at 20 °C, kinematic viscosity at 40 °C, iodine value, acid number, induction period and water content); **2)** adequacy of IR and ^1H NMR techniques and of Wijs method for the monitoring of degradation reactions of vegetable oil and biodiesel; **3)** development of two alternative methods for the quantification of methanol in biodiesel, from the ^1H NMR technique and the standard addition and the internal standard methods; **4)** development of two alternative methods for the quantification of biodiesel in diesel-biodiesel blends, one using UV-Vis and the other employing ^1H NMR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática da reação de transesterificação para a síntese do biodiesel, a partir de triacilglicerol e metanol, resultando em biodiesel metílico e glicerol.	20
Figura 2.	Representação da degradação de cadeias graxas de óleos, gorduras e do biodiesel, ilustrada a partir da cadeia do linoleato de metila (adaptado de FRANKEL, 1991).	25
Figura 3.	Decomposição da matriz X de m amostras com n variáveis em um produto de outras duas matrizes, <i>scores T</i> (amostras) e <i>loadings P</i> (peso das variáveis), mais a matriz de resíduos E .	32
Figura 4.	Atribuição das absorções observadas nos espectros de IV, exemplificada a partir de um espectro de óleo de girassol.	45
Figura 5.	Atribuição dos hidrogênios no espectro de RMN ¹ H, exemplificada a partir de um espectro de RMN ¹ H de óleo de linhaça.	46
Figura 6.	Principais diferenças entre o óleo de soja e seu biodiesel metílico nos espectros de IV e RMN ¹ H.	48
Figura 7.	Valores de referência × valores previstos para os modelos IV-PLS que determinam: período de indução, teor de água, viscosidade cinemática, massa específica, índices de iodo e acidez para óleo vegetal.	50
Figura 8.	Valores de referência × valores previstos para os modelos RMN ¹ H-PLS que determinam: período de indução, teor de água, viscosidade cinemática, massa específica, índices de iodo e acidez para óleo vegetal.	51
Figura 9.	Valores de referência × valores previstos para os modelos IV-PLS que determinam: período de indução, teor de água, viscosidade cinemática, massa específica, índices de iodo e acidez para biodiesel.	51

Figura 10.	Valores de referência \times valores previstos para os modelos RMN ^1H -PLS que determinam: período de indução, teor de água, viscosidade cinemática, massa específica, índices de iodo e acidez para biodiesel.	52
Figura 11.	Valores de RMSECV em função do número de variáveis latentes (LV) para os modelos IV-PLS e RMN ^1H -PLS, para a determinação do período de indução de óleo vegetal e de biodiesel.	55
Figura 12.	Monitoramento da degradação do óleo de soja e de seu biodiesel metílico pelo índice de iodo e por espectros de IV e RMN ^1H . Em que ---- representa o período de indução, obtido pelo método Rancimat.	59
Figura 13.	(a) Espectro de RMN ^1H do biodiesel de soja, (b) uma expansão de 3,45 a 3,90 ppm para destacar os principais sinais utilizados no método da adição de padrão e (c) espectros RMN ^1H do biodiesel de soja sem e com sucessivas adições de metanol.	61
Figura 14.	Curvas analíticas para a quantificação de metanol residual em biodiesel, pelo método da adição de padrão por RMN ^1H , para cada uma das seis amostras analisadas de biodiesel.	63
Figura 15.	Representação das interações intermoleculares via ligação de hidrogênio entre metanol e éster metílico.	63
Figura 16.	Espectro de RMN ^1H de biodiesel com éter metil terc-butílico como padrão interno para a quantificação de metanol.	64
Figura 17.	Gráfico de $ A_{\text{blenda}} - A_{\text{diesel}} $ em função do comprimento de onda e (b) uma expansão de 350 a 380 nm para destacar o comprimento de onda utilizado na quantificação de biodiesel em blendas diesel-biodiesel.	69
Figura 18.	Curva analítica para a quantificação de biodiesel em blendas diesel-biodiesel pela absorvância em 356 nm.	70

Figura 19.	Valores de referência × valores previstos pelo modelo UV-Vis–PLS para o teor de biodiesel em blendas diesel-biodiesel B10 adicionadas de óleo vegetal.	73
Figura 20.	Valores de RMSECV em função do número de variáveis latentes para o modelo UV-Vis–PLS, que quantifica o teor de biodiesel em blendas diesel-biodiesel B10 adicionadas de óleo vegetal.	75
Figura 21.	(a) Espectro de RMN ¹ H da blenda diesel-biodiesel B7 e (b) duas expansões para destacar os sinais utilizados no método por RMN ¹ H para quantificar biodiesel em blendas diesel-biodiesel.	77
Figura 22.	Curva analítica para a quantificação da concentração de biodiesel em blendas diesel-biodiesel, a partir da integral relativa do sinal do OCH ₃ do biodiesel no espectro RMN ¹ H.	78
Figura 23.	Espectros de RMN ¹ H do óleo de soja, do biodiesel de soja e do diesel S10 (b) uma expansão do espectro entre 4,10 e 4,35 ppm para destacar os sinais utilizados no método que permite quantificar óleo vegetal por RMN ¹ H, em blendas diesel-biodiesel.	80
Figura 24.	Curva analítica para a quantificação da concentração de óleo vegetal em blendas diesel-biodiesel, a partir da integral do sinal do CH ₂ da estrutura do glicerol dos triacilgliceróis no espectro RMN ¹ H.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Especificações do biodiesel impostas pela ANP no Brasil (ANP, 2014).	21
Tabela 2.	Descrição dos hidrogênios atribuídos no espectro de RMN ¹ H.	47
Tabela 3.	Resultados obtidos para os parâmetros estudados dos óleos vegetais (n=3).	49
Tabela 4.	Resultados obtidos para os parâmetros estudados dos biodieseis (n=3).	49
Tabela 5.	Valores previstos (V_p), valores de referências (V_r) e erro relativo para os seis parâmetros analisados para as amostras externas, a partir do modelo IV-PLS.	53
Tabela 6.	Valores previstos (V_p), valores de referências (V_r) e erro relativo para os seis parâmetros analisados para as amostras externas, a partir do modelo RMN ¹ H-PLS.	54
Tabela 7.	Parâmetros dos modelos IV-PLS e RMN ¹ H-PLS construídos para determinação dos seis parâmetros analisados nos óleos vegetais.	56
Tabela 8.	Parâmetros dos modelos IV-PLS e RMN ¹ H-PLS construídos para determinação dos seis parâmetros analisados nos biodieseis.	57
Tabela 9.	Concentração de metanol para as amostras de biodiesel analisadas pelos métodos BS EN 14110, AP por RMN ¹ H e PI por RMN ¹ H (n=3).	65
Tabela 10.	Resultados do teste F e do teste t de Student.	66

Tabela 11.	Figuras de mérito do método da adição de padrão por RMN ¹ H.	67
Tabela 12.	Figuras de mérito do método do padrão interno por RMN ¹ H.	67
Tabela 13.	Resultados da concentração de biodiesel para as amostras externas pelo método BS EN 14078 e pelo método UV-Vis proposto, além dos resultados dos testes F e t de Student.	70
Tabela 14.	Figuras de mérito do método univariado UV-Vis para quantificar biodiesel em blendas.	71
Tabela 15.	Concentração de biodiesel para as blendas B10 adicionadas de óleo vegetal, obtidas pelos métodos BS EN 14078 e UV-Vis (n=3).	72
Tabela 16.	Concentrações de biodiesel previstas pelos métodos univariados UV-Vis e BS EN 14078 e pelo modelo UV-Vis-PLS para as amostras externas de blendas adicionadas de óleo vegetal, além das concentrações de referência (n=3).	74
Tabela 17.	Parâmetros do modelo PLS para determinar o teor de biodiesel em blendas.	75
Tabela 18.	Resultados da concentração de biodiesel para as amostras externas pelo método EN 14078 e pelo método RMN ¹ H proposto, além dos resultados dos testes F e t de Student.	78
Tabela 19.	Concentração de biodiesel para as blendas B10 adicionadas de óleo vegetal, obtidas pelos métodos BS EN 14078 e RMN ¹ H (n=3).	79
Tabela 20.	Concentrações de biodiesel e de óleo vegetal a partir dos métodos RMN ¹ H para as amostras de blendas B10 adulteradas e seus respectivos valores de referência (n=3).	81
Tabela 21.	Figuras de mérito dos métodos RMN ¹ H.	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Nível de significância estatística
ν	Graus de liberdade em estatística
δ	Deslocamento químico em ressonância magnética nuclear
ρ	Modo de vibração molecular balanço (do inglês, <i>rocking</i>)
ν	Modo de vibração molecular estiramento
ν_{as}	Modo de vibração molecular estiramento assimétrico
ν_s	Modo de vibração molecular estiramento simétrico
δ_s	Modo de vibração molecular deformação angular simétrica
a	Intercepto
A_{blenda}	Absorbância da blenda
A_{diesel}	Absorbância do diesel
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
AP	Adição de padrão
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATR	Reflectância total atenuada (do inglês, <i>attenuated total reflectance</i>)
b	Coeficiente angular
BS EN	<i>British Standard European Norm</i>
B_x	Blenda diesel-biodiesel com x% de biodiesel
B_xO_{Vy}	Blenda diesel-biodiesel com x% de biodiesel e y% de óleo vegetal
C_{éter}	Concentração do éter metil terc-butílico
C_{metanol}	Concentração do metanol
DPR	Desvio padrão relativo
F	F de Snedecor
FID	Decaimento de indução livre (do inglês, <i>free induction decay</i>)
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier transform infrared</i>)
I_{CH₃}	Integral do sinal do metanol
I_{OCH₃}	Integral do sinal do éter metil terc-butílico
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção

LQ	Limite de quantificação
LV	Variáveis latentes (do inglês, <i>latent variables</i>)
M(éter)	Massa molar do éter metil terc-butílico
M(metanol)	Massa molar do metanol
n₁	Número de replicatas do método 1
n₂	Número de replicatas do método 2
PCA	Análise de componentes principais (do inglês, <i>principal component analysis</i>)
PC	Componente principal (do inglês, <i>principal component</i>)
PI	Padrão interno
PLS	Mínimos quadrados parciais (do inglês, <i>partial least squares</i>)
r	Coeficiente de correlação
r_{cal}	Coeficiente de correlação de calibração
r_{cv}	Coeficiente de correlação de validação cruzada
r_{pre}	Coeficiente de correlação de previsão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMSE	Raiz quadrada do erro médio quadrático (do inglês, <i>root mean squared error</i>)
RMSEC	Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (do inglês, <i>root mean squared error of calibration</i>)
RMSECV	Raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (do inglês, <i>root mean squared error of cross validation</i>)
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (do inglês, <i>root mean squared error of prediction</i>)
s	Estimativa do desvio padrão
t	t de Student
TAG	Triacilglicerol
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
V_p	Valor previsto
V_r	Valor de referência

SUMÁRIO

Capítulo 1: INTRODUÇÃO	18
1.1. O Biodiesel.....	19
1.2. A Qualidade do Biodiesel e do Óleo Vegetal (Matéria Prima).....	20
1.2.1. Massa Específica.....	22
1.2.2. Viscosidade Cinemática.....	23
1.2.3. Índice de Iodo.....	23
1.2.4. Índice de Acidez.....	24
1.2.5. Estabilidade Oxidativa.....	24
1.2.6. Teor de Água.....	24
1.3. A Estabilidade do Biodiesel e do Óleo Vegetal.....	25
1.4. A Utilização de Metanol para a Síntese do Biodiesel.....	27
1.5. A Blenda Diesel-Biodiesel.....	28
1.6. A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	29
1.7. A Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV).....	30
1.8. A Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	30
1.9. A Quimiometria.....	31
1.9.1. Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	32
Capítulo 2: OBJETIVOS	34
Capítulo 3: PARTE EXPERIMENTAL	36

3.1.	Análise “<i>Screening</i>” e Estabilidade de Óleo Vegetal e de Biodiesel.....	37
3.1.1.	Amostras.....	37
3.1.2.	Espectros na Região do IV Médio.....	37
3.1.3.	Espectros de RMN ¹H.....	38
3.1.4.	Massa Específica a 20 °C.....	38
3.1.5.	Viscosidade Cinemática a 40 °C.....	38
3.1.6.	Índice de Iodo.....	38
3.1.7.	Índice de Acidez.....	38
3.1.8.	Estabilidade Oxidativa.....	39
3.1.9.	Teor de Água.....	39
3.1.10.	Tratamento dos Dados.....	39
3.1.11.	Degradação do Óleo de Soja e do seu Biodiesel.....	39
3.2.	Quantificação de Metanol Residual em Biodiesel.....	40
3.2.1.	Amostras.....	40
3.2.2.	Método da Adição de Padrão (AP) por RMN ¹H.....	40
3.2.3.	Método do Padrão Interno (PI) por RMN ¹H.....	40
3.2.4.	Espectros de RMN ¹H.....	41
3.2.5.	Método por Cromatografia em Fase Gasosa (BS EN 14110).....	41
3.3.	Quantificação de Biodiesel em Blendas Diesel-Biodiesel.....	41
3.3.1.	Amostras.....	41
3.3.2.	Espectros na Região do UV-Vis.....	42

3.3.3. Espectros de RMN ¹ H.....	42
3.3.4. Método por Espectroscopia no IV (BS EN 14078).....	42
3.3.5. Tratamento dos Dados.....	43
Capítulo 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Análise “ <i>Screening</i> ” e Estabilidade de Óleo Vegetal e de Biodiesel.....	45
4.1.1. Espectros na Região do IV e de RMN ¹ H.....	45
4.1.2. Análise “ <i>Screening</i> ” de Óleo Vegetal e de Biodiesel.....	48
4.1.3. Degradação do Óleo de Soja e do seu Biodiesel.....	58
4.2. Quantificação de Metanol Residual em Biodiesel.....	61
4.2.1. Método da Adição de Padrão (AP) por RMN ¹ H.....	61
4.2.2. Método do Padrão Interno (PI) por RMN ¹ H.....	64
4.2.3. Comparação Estatística entre os Métodos.....	65
4.3. Quantificação de Biodiesel em Blendas Diesel-Biodiesel.....	68
4.3.1. Método Univariado por UV-Vis.....	68
4.3.2. Método Multivariado por Modelo UV-Vis–PLS.....	72
4.3.3. Método Univariado por RMN ¹ H.....	76
Capítulo 5: CONCLUSÃO.....	83
Capítulo 6: TRATAMENTO DE RESÍDUOS.....	86
Capítulo 7: PERSPECTIVAS.....	88
Capítulo 8: REFERÊNCIAS.....	90

CAPÍTULO 1:
INTRODUÇÃO

1.1. O Biodiesel

Suprir a demanda energética mundial tem sido um grande desafio para a sociedade. A variação do preço do petróleo e as questões ambientais relacionadas à queima de combustível fóssil também têm colaborado para que a sociedade busque novas fontes energéticas. O uso em larga escala da energia proveniente da biomassa é uma opção que pode contribuir para o desenvolvimento sustentável nas áreas ambiental, social e econômica (ROY *et al.*, 2016; LÔBO *et al.*, 2009).

Nesse contexto, óleo vegetal já foi testado e utilizado como combustível nos motores a diesel. Entretanto, por razões econômicas e técnicas, ele não foi capaz de competir com o diesel de petróleo. Já o biodiesel, é um exemplo da efetiva implementação da biomassa para produção de energia, e apresenta grande potencial para contribuir na demanda energética (ROY *et al.*, 2016; LÔBO *et al.*, 2009).

O biodiesel é um biocombustível sintetizado a partir de óleos e gorduras e que, atualmente, é adicionado ao diesel mineral. Esta mistura, diesel-biodiesel, pode ser usada em motores a diesel sem qualquer modificação do motor, uma vez que o biodiesel apresenta propriedades semelhantes às do diesel (ATABANI *et al.*, 2012). Além disso, é obtido a partir de matéria prima renovável, é biodegradável, não tóxico e gera menos impactos ambientais em comparação ao diesel de petróleo (LEUNG *et al.*, 2006).

No contexto da química, o biodiesel é uma mistura de alquil ésteres de cadeia linear, obtida a partir da transesterificação dos triacilgliceróis de óleos e gorduras com álcoois de cadeia curta (PINTO *et al.*, 2005; SCHUCHARDT *et al.*, 1998). A Figura 1 ilustra a reação de transesterificação, a partir de triacilglicerol e metanol, resultando em biodiesel metílico e glicerol.

A reação de transesterificação é realizada na presença de catalisadores ácidos, básicos ou enzimáticos. Os catalisadores mais utilizados são os alcalinos, pois são mais eficientes e promovem alto rendimento da reação. Dentre estes, os alcóxidos são mais ativos, resultando em rendimentos superiores a 98%; entretanto, são mais sensíveis em relação à presença de água no meio reacional. Os hidróxidos de sódio e de potássio, embora menos ativos, apresentam baixo custo, promovem

rendimentos satisfatórios e têm sido mais amplamente utilizados (SILVA *et al.*, 2015; LÔBO *et al.*, 2009).

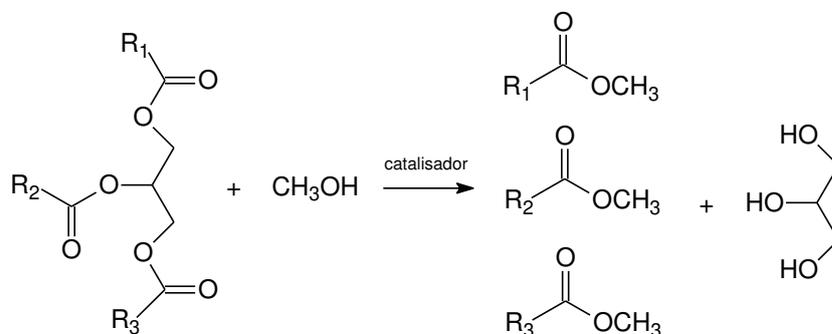


Figura 1. Representação esquemática da reação de transesterificação para a síntese do biodiesel, a partir de triacilglicerol e metanol, resultando em biodiesel metílico e glicerol.

1.2. A Qualidade do Biodiesel e do Óleo Vegetal (Matéria Prima)

Com a finalidade de garantir a qualidade do biodiesel, este deve atender a algumas especificações impostas por normas, tais como: ASTM D6751-15a, BS EN 14214:2012+A1:2014, ou Resolução ANP N^o 45. Nessas normas, foram fixados teores limites de parâmetros e de contaminantes para ajustar a qualidade do produto, assim como do seu desempenho no motor, e garantir a segurança no transporte e manuseio. Além disso, estabeleceram-se também monitoramentos para averiguar possíveis degradações durante a estocagem (ASTM, 2015; BS EN, 2014b; ANP, 2014; LÔBO *et al.*, 2009).

Os parâmetros estabelecidos nas normas são provenientes da normatização do diesel de petróleo ou do controle de qualidade de óleo vegetal. A qualidade do biodiesel pode variar em função das estruturas moleculares dos seus ésteres ou devido à presença de contaminantes vindos da matéria prima, do processo de produção ou formados durante a estocagem do biodiesel (LÔBO *et al.*, 2009).

A Tabela 1 apresenta as 24 especificações do biodiesel impostas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) no Brasil. Para um biodiesel ser considerado adequado para comercialização é necessário determinar todas as propriedades físico-químicas e as concentrações das espécies

presentes na Tabela 1, sendo que os resultados devem estar de acordo com as faixas de limites estabelecidos (ANP, 2014).

Tabela 1. Especificações do biodiesel impostas pela ANP no Brasil (ANP, 2014).

Característica	Especificação	Limite	Unidade
Propriedades	Aspecto	Límpido e isento de impurezas	adimensional
	Massa específica a 20° C	850 a 900	kg m ⁻³
	Viscosidade cinemática a 40°C	3,0 a 6,0	mm ² s ⁻¹
	Ponto de fulgor	mín.100,0	°C
	Cinzas sulfatadas	máx. 0,020	% massa
	Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C	máx. 1	adimensional
	Número cetano	Anotar	adimensional
	Ponto de entupimento de filtro a frio	máx. 5 a 19 (depende do estado do Brasil e do mês)	°C
	Índice de acidez	máx. 0,50	mg KOH g ⁻¹
	Índice de lodo	Anotar	g (100 g) ⁻¹
	Estabilidade à oxidação a 110°C	mín. 8	h
Concentrações	Teor de água	máx. 200,0	mg kg ⁻¹
	Contaminação total	máx. 24	mg kg ⁻¹
	Teor de éster	mín. 96,5	% massa
	Enxofre total	máx. 10	mg kg ⁻¹
	Sódio + Potássio	máx. 5	mg kg ⁻¹
	Cálcio + Magnésio	máx. 5	mg kg ⁻¹
	Fósforo	máx. 10	mg kg ⁻¹
	Glicerol livre	máx. 0,02	% massa
	Glicerol total	máx. 0,25	% massa
	Monoacilglicerol	máx. 0,7	% massa
	Diacilglicerol	máx. 0,20	% massa
	Triacilglicerol	máx. 0,20	% massa
	Metanol e/ou Etanol	máx. 0,20	% massa

Para garantir a qualidade do biodiesel é importante também garantir a qualidade da matéria prima (óleo vegetal, por exemplo), pois as propriedades do óleo utilizado para sua obtenção influenciam diretamente os procedimentos de síntese e de purificação, assim como as características do biodiesel obtido.

As propriedades físico-químicas e a reatividade de óleos vegetais variam em função da composição, o que reflete na viabilidade técnica e na econômica do seu uso como matéria prima para a produção de biodiesel de boa qualidade. Além disso, as substâncias presentes nos óleos vegetais também influenciam a queima do biodiesel no motor, podendo conduzir à formação de depósitos no sistema de injeção, e o tipo e a quantidade de gases poluentes emitidos (DABDOUB & BRONZEL, 2009; SUAREZ *et al.*, 2009).

Considerando-se o elevado número de análises impostas pelas normas (ASTM, 2015; BS EN, 2014b; ANP, 2014) para assegurar a boa qualidade do biodiesel e de suas matérias primas, assim como os inconvenientes decorrentes do uso de solventes tóxicos e a geração de resíduos, é atribuição da Química Analítica o desenvolvimento de novos métodos analíticos que visem, por um lado, a redução do número de análises para esta caracterização e, por outro, que evitem o uso de solventes tóxicos. Isto pode ser obtido, em parte, por correlações entre os parâmetros de qualidade ou entre informações químicas do produto e diversas características da amostra. Assim, pode-se contribuir para a obtenção de resultados seguros de forma rápida e relativamente simples, tanto para óleo vegetal como para biodiesel.

As técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e de absorção na região do infravermelho (IV) médio proporcionam informações relevantes em relação aos compostos orgânicos. Nesse contexto, este trabalho visou buscar correlações entre dados obtidos por essas técnicas e parâmetros de qualidade de óleo vegetal e de biodiesel. A partir dos espectros obtidos por ambas as técnicas foram construídos modelos de calibração multivariada para a determinação de massa específica, viscosidade cinemática, índice de iodo, índice de acidez, período de indução e teor de água.

Uma breve explicação de cada um desses parâmetros de qualidade está situada nas subseções a seguir.

1.2.1. Massa Específica

A massa específica do biodiesel está diretamente relacionada à estrutura química dos compostos que o constituem. No biodiesel, o tamanho da cadeia

carbônica e o número de insaturações influenciam diretamente a densidade. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica do alquil éster, maior será a densidade; entretanto, este parâmetro diminuirá quanto maior for o número de insaturações presentes na molécula. Além disso, impurezas e aditivos também poderão influenciar o valor desta propriedade (TESFA *et al.*, 2010; LÔBO *et al.*, 2009).

1.2.2. Viscosidade Cinemática

A viscosidade também está diretamente relacionada às estruturas moleculares e é definida como uma medida da resistência do fluido ao fluxo. A viscosidade cinemática do biodiesel aumenta com o comprimento da cadeia e é fortemente influenciada pela natureza e pelo número de ligações duplas. Além disso, aumenta acentuadamente com a polimerização (KNOTHE & STEIDLEY, 2005). A alta viscosidade gera heterogeneidade na combustão do biodiesel, ocasionando a deposição de resíduos no motor (LÔBO *et al.*, 2009).

1.2.3. Índice de Iodo

O índice de iodo é uma medida da quantidade de ligações duplas em uma amostra. Esse índice especifica a massa de iodo (I_2) em gramas que é consumida por 100 gramas de amostra. Um dos procedimentos mais utilizados para a determinação do índice de iodo é conhecido como método de Wijs. Ele é baseado no reagente ICl (monocloreto de iodo) dissolvido em ácido acético glacial. Esta mistura é conhecida como reagente de Wijs ou solução de Wijs. O método de Wijs produz qualidade analítica, no entanto, a utilização do reagente requer um manuseio cuidadoso devido à sua toxicidade (SHIMAMOTO *et al.*, 2016; SHIMAMOTO *et al.*, 2015).

Alguns fatores que influenciam o índice de iodo são as condições de armazenamento e a idade do biodiesel ou do óleo vegetal, especialmente se a amostra sofreu processos de oxidação (SHIMAMOTO *et al.*, 2015; LÔBO *et al.*, 2009; KNOTHE, 2002). Com a degradação dessas amostras, espera-se que haja uma diminuição no número de insaturações (FRANKEL, 1991).

1.2.4. Índice de Acidez

O índice de acidez quantifica, de certo modo, os produtos ácidos formados nas reações de degradação do óleo ou do biodiesel e é expresso em miligramas de KOH por grama de amostra. A determinação deste parâmetro ao longo do armazenamento é importante para monitorar a ocorrência de reações de degradação (ARICETTI & TUBINO, 2012a e 2012b; LÔBO *et al.*, 2009).

1.2.5. Estabilidade Oxidativa

A estabilidade oxidativa é um parâmetro comparativo que é amplamente aplicado no controle de qualidade de matérias primas e do biodiesel. Além disso, ele é muito útil para a avaliação da eficiência de aditivos antioxidantes.

O método utilizado para a determinação da estabilidade oxidativa é conhecido como Rancimat e envolve a exposição da amostra a um fluxo constante de ar, em temperatura controlada e elevada, normalmente 110 °C. Sob estas condições, a formação dos compostos resultantes da oxidação é intensificada e os compostos voláteis são conduzidos, pela corrente de ar, para uma cela contendo água deionizada, cuja condutividade é medida continuamente. A estabilidade oxidativa é expressa pelo período de indução (em horas). Este é determinado no ponto em que o nível de condutividade, na cela coletora, aumenta rapidamente, sinalizando o início do processo de oxidação global (PULLEN & SAEED, 2012; LÔBO *et al.*, 2009).

1.2.6. Teor de Água

O teor de água pode influenciar a degradação do óleo ou do biodiesel e a proliferação de microrganismos, afetando a qualidade (LÔBO *et al.*, 2009; KNOTHE, 2007). A titulação Karl Fischer é o método mais utilizado para medir o teor de água (umidade) em óleos, solventes e outros produtos. O método envolve a titulação de uma amostra dissolvida em metanol com reagente de Karl Fischer (FELGNER *et al.*, 2008).

1.3. A Estabilidade do Biodiesel e do Óleo Vegetal

Ao contrário dos combustíveis fósseis, o biodiesel degrada-se facilmente com o tempo (BORSATO, 2012). A degradação aumenta a viscosidade, eleva a acidez e gera gomas e sedimentos que entopem os filtros de combustível (KNOTHE, 2007). Assim, torna-se relevante o estudo dos processos químicos que levam à degradação desses produtos, e há um crescente interesse pelo uso de antioxidantes, cuja aplicação depende do entendimento dos processos oxidativos que ali ocorrem.

O principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras é denominado auto-oxidação. Esse mecanismo é formado por diversas reações e ainda não é totalmente elucidado, devido à sua complexidade (SILVA *et al.*, 1999). Farmer e colaboradores (1942) propuseram uma sequência de reações com o objetivo de explicar a degradação dos lipídios denominada auto-oxidação (Figura 2).

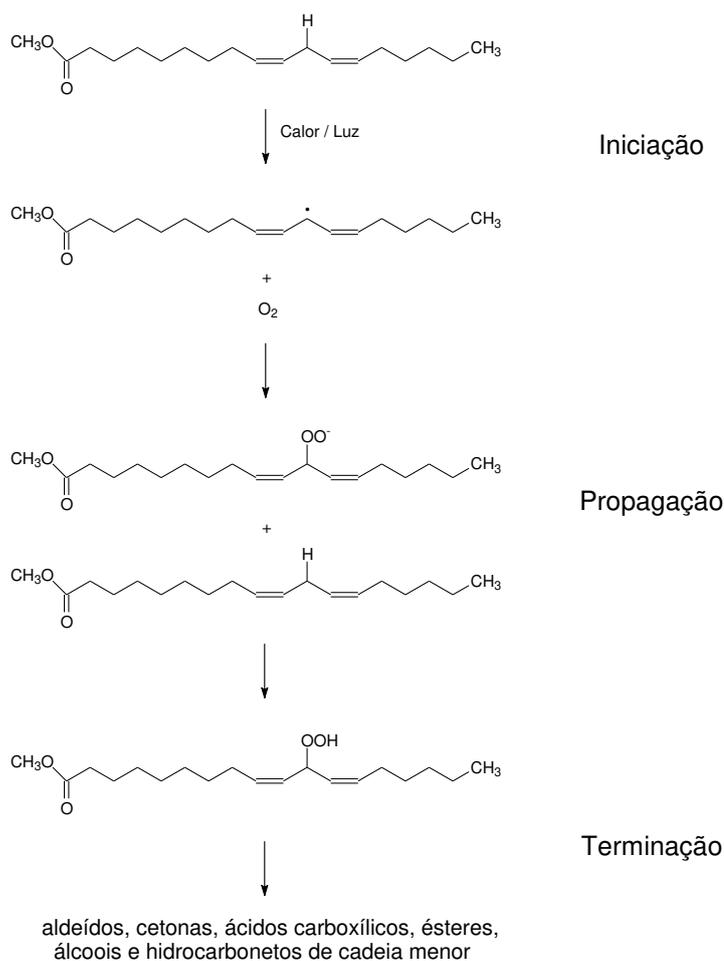


Figura 2. Representação da degradação de cadeias graxas de óleos, gorduras e do biodiesel, ilustrada a partir da cadeia do linoleato de metila (adaptado de FRANKEL, 1991).

A Figura 2 mostra que a auto-oxidação dos lipídios está associada à reação do oxigênio (O_2) com as cadeias graxas insaturadas (de óleos, gorduras ou do biodiesel) em três etapas: iniciação, propagação e terminação.

Na iniciação, a formação de radicais livres da cadeia graxa ocorre devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico, em condições favorecidas por luz e calor. Quando há a formação do radical livre, o grupamento adjacente à ligação dupla torna-se altamente reativo frente às moléculas de oxigênio (YAAKOB *et al.*, 2014; FRANKEL, 2005; SILVA *et al.*, 1999).

Na propagação, os radicais livres são convertidos em outros radicais pela reação com oxigênio, surgindo os produtos primários da oxidação, os peróxidos e os hidroperóxidos. Nessa etapa os radicais livres atuam como propagadores da reação, tornando o processo autocatalítico (YAAKOB *et al.*, 2014; FRANKEL, 2005; SILVA *et al.*, 1999).

Na terminação, há o acúmulo de peróxidos e hidroperóxido que se decompõem, dando origem a compostos de oxidação secundários, como por exemplo, aldeídos, cetonas, compostos voláteis, polares e polímeros (YAAKOB *et al.*, 2014; FRANKEL, 2005; SILVA *et al.*, 1999; HIATT *et al.*, 1968)

Para impedir ou, pelo menos, minimizar a degradação de óleos, de gorduras e do biodiesel, é necessário reduzir a incidência de todos os fatores que a favorecem: diminuir ao máximo a exposição à radiação e a elevadas temperaturas, evitar a presença de íons metálicos na amostra e diminuir o contato com o oxigênio. Estes cuidados são importantes, uma vez que eles são responsáveis pelo desencadeamento dos processos de oxidação. Além disso, substâncias antioxidantes podem ser utilizadas para prevenir a formação dos radicais livres (SILVA *et al.*, 1999).

Nesse contexto, foram realizados estudos relacionados à degradação do óleo de soja e do seu biodiesel metílico. Para tal, foi monitorada a degradação ocasionada por oxidação induzida (110 °C e fluxo de ar de 10 L h⁻¹) utilizando as técnicas de espectroscopia na região do IV médio, de RMN ¹H e o índice de iodo. Esses estudos visaram avaliar ambas as técnicas instrumentais e o método clássico de Wijs como ferramentas para serem utilizadas, posteriormente, nas pesquisas que

buscam identificar novos antioxidantes, verificando a eficiência destes em retardar os processos de degradação.

1.4. A Utilização de Metanol para a Síntese do Biodiesel

O metanol é o álcool mais utilizado na reação de transesterificação. Este álcool é altamente reativo e gera melhores rendimentos em temperaturas mais baixas e menores tempos de reação, em comparação com outros álcoois (LÔBO *et al.*, 2009). Além disso, como o metanol é o álcool com a cadeia de carbono mais curta, ele apresenta polaridade elevada. Conseqüentemente, o processo de separação do biodiesel do glicerol formado na síntese é mais fácil, uma vez que o metanol não atua como um bom agente tensoativo (SILVA *et al.*, 2015).

Os resíduos de metanol, glicerol, catalisador e contaminantes devem ser removidos do biodiesel para garantir a boa qualidade do produto final. As normas americana, europeia e brasileira permitem até 0,20% m/m de metanol residual no biodiesel (ATSM, 2015; BS EN 14214, 2014b; ANP N°15, 2014), devido à influência do metanol na corrosão de metais, bem como no ponto de fulgor do combustível (BOOG *et al.*, 2011).

Alguns métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação do álcool residual no biodiesel. A maioria deles utiliza cromatografia em fase gasosa, baseados na norma BS EN 14110 (LÔBO *et al.*, 2009; PARASCHIVESCU *et al.*, 2008; BS EN 2003b), enquanto outros envolvem espectroscopia no IV próximo (FELIZARDO *et al.*, 2007a; FELIZARDO *et al.*, 2007b), que requer o uso de ferramentas quimiométricas. Um método de injeção em fluxo (ARAUJO *et al.*, 2008) e uma correlação entre o teor de metanol e ponto de fulgor (BOOG *et al.*, 2011) também são relatados na literatura para a quantificação de metanol em biodiesel.

O desenvolvimento de outros métodos para a determinação do teor de metanol em biodiesel é necessário para oferecer uma melhor gama de possibilidades analíticas. Assim, um dos objetivos deste estudo foi desenvolver métodos com a espectroscopia de RMN ¹H para quantificar metanol residual em biodiesel de diferentes fontes vegetais. Dentre os métodos desenvolvidos, um aplica o procedimento da adição de padrão, em que o metanol é adicionado diretamente em alíquotas de amostras a serem analisadas. No outro é empregado éter metil terc-

butílico como um padrão interno (SANTOS & COLNAGO, 2013; SKOOG *et al.*, 1996).

1.5. A Blenda Diesel-Biodiesel

O combustível diesel atualmente (2017) comercializado no Brasil é uma mistura de diesel mineral com 8% v/v de biodiesel (B8). Esta percentagem vem aumentando desde 2008, quando o valor obrigatório era de 2% v/v (B2), e há uma tendência para aumentar ainda mais esse teor (PIMENTEL *et al.*, 2006). Para março de 2019, o teor de biodiesel está previsto para 10% v/v (B10) (PORTAL BRASIL, 2017; ANP, 2016).

Para a determinação de biodiesel em blendas diesel-biodiesel, métodos oficiais, como os descritos nas normas BS EN 14078 (2014a) e ASTM D7371-14 (2014), que usam espectroscopia no IV médio com calibrações uni e multivariada, respectivamente, são descritos na literatura. No entanto, estes métodos não consideram a possibilidade da presença de óleo vegetal como contaminante ou adulterante (PAIVA *et al.*, 2015).

Essas blendas podem ser facilmente adulteradas com óleo vegetal, seja como uma adição intencional e ilegal desta matéria prima ou por causa de um baixo grau de conversão da reação de transesterificação, durante a síntese do biodiesel (PAIVA *et al.*, 2015). Independentemente do motivo, a presença de óleo vegetal nas blendas diesel-biodiesel não é conveniente. Esse óleo pode influenciar várias características e parâmetros, e pode causar danos aos motores a diesel (PINTO *et al.*, 2005).

Portanto, considerando que a adulteração poderá ocorrer após a adição do biodiesel ao diesel, é muito importante garantir que as blendas diesel-biodiesel estejam de acordo com as normas e regulamentos de qualidade (ANP, 2016), assim como ocorre na verificação da qualidade do biodiesel (ANP, 2014).

Neste sentido, métodos de quantificação de biodiesel em misturas diesel-biodiesel e que sejam capazes de considerar a possibilidade da presença de óleo vegetal como adulterante são importantes para avaliar a qualidade destas blendas.

Alguns métodos analíticos têm sido relatados para a determinação de biodiesel em blendas e adulterações (MUSHARRAF *et al.*, 2015; BRANDÃO *et al.*, 2012; GAYDOU *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2011; MAHAMUNI *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2009a; MONTEIRO *et al.*, 2009b; MONTEIRO *et al.*, 2009c; PIMENTEL *et al.*, 2006). No entanto, ainda há perspectivas para o desenvolvimento de métodos mais simples, com menos etapas e que, além de seletivos para ésteres, sejam específicos para biodiesel.

Considerando o panorama acima, foram desenvolvidos dois métodos alternativos para a quantificação de biodiesel em blendas. O primeiro emprega espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) associada à quimiometria. O segundo utiliza espectroscopia de RMN ^1H . Os procedimentos sugeridos constituem análises alternativas simples e mais eficientes em relação ao método oficial.

1.6. A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

De forma simplificada, a RMN é uma técnica na qual a amostra é submetida a um campo magnético homogêneo e constante, irradiada, e um sinal magnético proveniente dos núcleos atômicos é detectado. Esse sinal magnético detectado é chamado de decaimento de indução livre (FID, do inglês *free induction decay*), que após processamento revela informações da amostra para a sua caracterização ou quantificação (SIMPSON, 2008).

A partir da RMN ^1H , é possível extrair informações sobre as fórmulas moleculares, estruturais e geométricas de compostos orgânicos (SIMPSON, 2008). Apesar do elevado custo de um equipamento de RMN, existem muitas vantagens na utilização da técnica. Por exemplo, as análises qualitativas e quantitativas podem ser realizadas simultaneamente, as medidas podem ser rápidas (núcleos abundantes, tais como ^1H), a técnica não requer o isolamento do analito, quando presente em misturas, e a análise pode ser realizada simultaneamente para diferentes analitos em um mesmo espectro, entre outras vantagens (SANTOS & COLNAGO, 2013). Além disso, muitas vezes, há equipamentos de RMN disponíveis em muitas instituições para multiusuários.

1.7. A Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

A radiação IV está situada entre as regiões do visível e das micro-ondas. Ao absorver radiação na região do IV, as moléculas a convertem em energia de vibração molecular. Embora este processo seja quantizado, o espectro vibracional é normalmente formado por bandas e não por linhas, uma vez que cada nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Embora o espectro de IV seja característico da molécula como um todo, alguns grupos de átomos dão origem a bandas que apresentam, aproximadamente, a mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. Essas bandas típicas são muito utilizadas na caracterização qualitativa de compostos orgânicos. Além disso, o espectro de IV é uma excelente ferramenta para análise quantitativa, uma vez que as intensidades de absorção das bandas são proporcionais à concentração da substância em estudo (SILVERSTEIN *et al.*, 2005; RUSCHEL *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2013).

1.8. A Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A absorção nas regiões do ultravioleta e do visível do espectro está relacionada à estrutura eletrônica da molécula. Essa absorção de energia é quantizada e promove elétrons que se encontram em orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia, ou seja, para estados excitados. Os espectros eletrônicos apresentam-se como bandas largas, uma vez que cada nível energético eletrônico apresenta diversos níveis energéticos vibracionais e rotacionais (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Apesar da baixa seletividade dos métodos que utilizam espectroscopia na região do ultravioleta-visível, esta técnica é muito utilizada para fins quantitativos. Isto decorre, por um lado, do fato que a absorção de energia nesta faixa do espectro, representada pelas bandas eletrônicas, é proporcional às concentrações das espécies absorventes e, por outro lado, a instrumentação é simples e de custo relativamente baixo, tanto na aquisição do equipamento como em sua manutenção (SKOOG *et al.*, 1998).

1.9. A Quimiometria

A análise multivariada de dados químicos, aplicada para avaliação e interpretação, é denominada “Quimiometria” e está fundamentada pelas ciências Química, Matemática e Estatística. Pode-se considerar que tenha sido introduzida em 1972, a partir dos trabalhos do sueco Svante Wold e do americano Bruce R. Kowalski (SHARAF *et al.*, 1986; BEEBE *et al.*, 1998). Desde então, a Química Analítica, dentre outras áreas, vem utilizando as ferramentas quimiométricas para expandir a potencialidade das respostas e viabilizar interpretações mais abrangentes.

A quimiometria permite a análise de um grande número de variáveis de forma simultânea (BRUNS & FAIGLE, 1985). Com ela, é possível encontrar correlações entre as amostras, entre as variáveis e entre amostras e variáveis, extraindo-se maior quantidade de informação que possa ser útil. Nesse contexto, os procedimentos quimiométricos têm sido utilizados para diversas finalidades, como otimização de experimentos, análise exploratória, classificação, calibração, dentre outras (BEEBE *et al.*, 1998).

Para uma análise multivariada a partir das ferramentas quimiométricas, os dados devem ser inicialmente organizados e, se necessário, receber pré-tratamentos e/ou pré-processamentos. Um conjunto bidimensional de dados geralmente é organizado na forma de uma matriz \mathbf{X} , com m linhas que representam as amostras e n colunas, representando as variáveis. No caso de espectros, as variáveis são os valores de comprimento de onda, ou número de onda, ou deslocamento químico, ou energia.

Podem ser realizados alguns pré-tratamentos nas amostras (nas linhas) como o alisamento dos espectros ou a aplicação de funções derivadas, dentre outros. Já o pré-processamento aplica-se às variáveis (nas colunas). Nos espectros, geralmente há regiões mais importantes que outras pela presença de picos ou bandas, sendo um pré-processamento comum centrar os dados na média, como foi utilizado neste trabalho. Este procedimento implica na subtração do elemento de cada coluna pelo valor médio dos elementos dessa coluna, obtendo-se como resultado uma matriz na qual todas as colunas têm média zero (BEEBE *et al.*, 1998).

1.9.1. Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *partial least squares*) é um procedimento de calibração multivariada que utiliza análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) para reduzir a dimensão do conjunto de dados (BEEBE *et al.*, 1998).

O procedimento de PCA decompõe a matriz original de dados \mathbf{X} em um produto de outras duas matrizes \mathbf{T} (*scores*) e \mathbf{P}^t (*loadings*) mais uma matriz de resíduos \mathbf{E} (Figura 3). Enquanto a matriz de *scores* traz informações relacionadas às amostras, a matriz de *loadings* apresenta informações das variáveis (BEEBE *et al.*, 1998).

Scores representam as coordenadas das amostras no novo sistema de eixos, formado pelas componentes principais. Cada componente principal (PC, do inglês *principal component*) é construída pela combinação linear das variáveis originais e os coeficientes da combinação são chamados *loadings*, que representam o quanto cada variável original contribui para a formação de uma PC específica (BEEBE *et al.*, 1998).

$$\begin{array}{c} n \\ \boxed{\mathbf{X}} \\ m \end{array} = \begin{array}{c} d \\ \boxed{\mathbf{T}} \\ m \end{array} \times \begin{array}{c} n \\ \boxed{\mathbf{P}^t} \\ d \end{array} + \begin{array}{c} n \\ \boxed{\mathbf{E}} \\ m \end{array}$$

Figura 3. Decomposição da matriz \mathbf{X} de m amostras com n variáveis em um produto de outras duas matrizes, *scores* \mathbf{T} (amostras) e *loadings* \mathbf{P} (peso das variáveis), mais a matriz de resíduos \mathbf{E} .

Na calibração multivariada por PLS, é feita uma correlação entre um conjunto de dados, tais como espectros na matriz \mathbf{X} , e as propriedades de interesse, organizadas em outra matriz, denominada \mathbf{Y} . As propriedades de interesse podem ser características físicas ou químicas como, por exemplo, a concentração de um analito (DE SOUZA *et al.*, 2013).

A matriz \mathbf{X} é decomposta por PCA como na Figura 3 (Equação 1) e a matriz \mathbf{Y} é decomposta de forma análoga de acordo com a Equação 2.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \times \mathbf{P}^t + \mathbf{E} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U} \times \mathbf{Q}^t + \mathbf{F} \quad (\text{Equação 2})$$

Os valores dos *scores* nas matrizes **T** e **U** são alterados até que o melhor modelo linear seja estabelecido entre eles e assim, a maior covariância entre **X** e **Y** seja obtida. Isso é realizado em várias etapas, que são repetidas para cada PC, estimada a partir de um processo iterativo. Deste modo, há no PLS um compromisso entre a explicação da variância em **X** e a obtenção da maior correlação com **Y**. Como no cálculo das PCs, os valores da propriedade de interesse presentes em **Y** são levados em consideração (sendo, portanto um método supervisionado), as PCs passam a ser nomeadas de variáveis latentes, LV (do inglês, *latent variables*) (DE SOUZA *et al.*, 2013).

O número de LV a ser utilizado é comumente selecionado por validação cruzada com o procedimento *leave-one-out* (“um por vez”). Neste processo, uma amostra do conjunto de calibração é excluída, o modelo é estabelecido com as demais e é realizada a previsão da propriedade de interesse para esta amostra empregando um número crescente de LV. Este artifício é então repetido para todas as amostras e um erro é calculado para cada número de variável latente. O valor de variável latente a partir do qual não existe variação considerável no erro é utilizado para determinar o número de LV a ser utilizado no modelo. (DE SOUZA *et al.*, 2013; GELADI & KOWALSKI, 1986).

Definido o número de LV e obtido o modelo de regressão, este deve ser testado por validação externa, com amostras que não foram utilizadas na etapa de calibração. Estas amostras devem ter seus valores da propriedade de interesse previamente conhecidos, para verificar a capacidade de previsão do modelo (DE SOUZA *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 1999).

CAPÍTULO 2:
OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos gerais:

- Desenvolver métodos mais simples para a caracterização e o controle de qualidade de óleo vegetal, biodiesel e blenda diesel-biodiesel, visando à redução ou eliminação da utilização de solvente e a geração de resíduos.
- Extrair informações que contribuam para caracterizar e determinar os parâmetros de qualidade dessas amostras (óleo vegetal, biodiesel e blenda diesel-biodiesel) a partir de técnicas espectroanalíticas como espectroscopia de RMN ^1H , IV e UV-Vis.
- Buscar possíveis correlações entre os dados experimentais e diversas propriedades do óleo vegetal, do biodiesel e da blenda, visando o desenvolvimento de métodos alternativos e/ou a redução do número de análises necessárias para caracterizá-los.

Foram objetivos específicos deste trabalho:

- Construir modelos de calibração multivariada, por PLS, a partir dos espectros obtidos por IV e RMN ^1H , para a determinação simultânea de massa específica, viscosidade cinemática, índice de iodo, índice de acidez, período de indução e teor de água em amostras de óleo vegetal e de biodiesel.
- Avaliar a adequação das técnicas de IV e RMN ^1H , além do índice de iodo, no acompanhamento da degradação do óleo de soja e do seu biodiesel metílico.
- Desenvolver métodos, a partir da técnica de RMN ^1H , para quantificar metanol residual em biodiesel, aplicando-se o método da adição de padrão e o método do padrão interno.
- Desenvolver métodos alternativos para a quantificação de biodiesel em blendas, utilizando-se as técnicas UV-Vis e RMN ^1H , como alternativas mais práticas e mais eficientes do que o método oficial.

CAPÍTULO 3:
PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Análise “*Screening*” e Estabilidade de Óleo Vegetal e de Biodiesel

3.1.1. Amostras

Para os estudos com óleos, foram utilizados óleos vegetais de girassol, canola, soja, milho, castanha do Brasil, algodão, arroz, linhaça e linhaça dourada, gergelim e um óleo misto de gergelim com gergelim torrado. Para os estudos com biodieseis, estes foram sintetizados a partir de óleos refinados (soja, canola, girassol, milho, algodão, babaçu e microalga *Chlorella protothecoides*) e não refinados (gergelim, linhaça, amêndoa de macaúba e palmiste). Utilizou-se também, óleo residual de fritura. A síntese dos biodieseis foi realizada de acordo com procedimentos otimizados pelo nosso grupo de pesquisa e já reportados (SILVA *et al.*, 2015).

Os óleos foram adquiridos no mercado local de Campinas-SP ou doados pelo Laboratório de Extração, Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio (EXTRA-E), da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, e o óleo residual de fritura foi doado por um restaurante da região de Campinas-SP.

3.1.2. Espectros na Região do IV Médio

Cada óleo foi aplicado como um filme entre duas celas de NaCl e os espectros na região do IV médio foram obtidos, em triplicata, no espectrômetro de absorção com transformada de Fourier MB102 (Bomem). Foram utilizadas as seguintes condições experimentais: janela espectral de 4000 a 600 cm^{-1} , resolução espectral de 2 cm^{-1} e 16 varreduras.

Os espectros de IV médio das amostras de biodiesel foram obtidos, em triplicata, no espectrômetro Agilent FTIR Cary 630, utilizando o acessório ATR (do inglês, *attenuated total reflectance*). Para obter os espectros, uma gota de cada amostra de biodiesel foi posicionada no amostrador. Foram utilizadas as seguintes condições experimentais: janela espectral de 4000 a 600 cm^{-1} , resolução espectral de 2 cm^{-1} e 64 varreduras.

3.1.3. Espectros de RMN ^1H

Para a obtenção dos espectros de RMN ^1H , 20 μL de cada óleo ou biodiesel foram dissolvidos em 600 μL de CDCl_3 , contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna, e os espectros foram obtidos, em triplicata, no espectrômetro de RMN Bruker Avance III 500 MHz. Foram utilizadas as seguintes condições experimentais: sequência de pulso zg30, janela espectral de -4,00 a 16,00 ppm, espectro com 32768 pontos, pulso de 90° calibrado de 11,75 μs , intervalo entre pulsos de 5 s e 16 varreduras.

3.1.4. Massa Específica a 20 $^\circ\text{C}$

As medidas de massa específica foram obtidas em triplicatas, a partir da medida das massas das amostras contidas em balões volumétricos de 5 mL submetidos à temperatura de 20 $^\circ\text{C}$ em banho termostaticado (Templette TE-8D Refrigerador Bath ESRB-11 Techne).

3.1.5. Viscosidade Cinemática a 40 $^\circ\text{C}$

As medidas de viscosidade cinemática foram realizadas em triplicatas, a partir de tubos viscosimétricos cinemáticos (Cannon Fenske) em banho termostático (Quimis) a 40 $^\circ\text{C}$, de acordo com o método ASTM D445-17a (2017).

3.1.6. Índice de Iodo

Para determinação do índice de iodo, seguiu-se a norma BS EN 14111 (2003a), utilizando o método de Wijs potenciométrico. As medidas foram feitas em triplicata, utilizando o titulador 809 Titrando (Metrohm) com eletrodo combinado de anel de platina (eletrólito constituído por solução de KCl) e amostrador automático 814 USB Sample Processor (Metrohm).

3.1.7. Índice de Acidez

O Índice de acidez foi determinado seguindo o método descrito pela *American Oil Chemists' Society* (AOCS) Cd 3d-63 (1973). As medidas foram feitas

em triplicata, utilizando o titulador 809 Titrande (Metrohm), com eletrodo Solvotrode (Metrohm) formado por eletrólito constituído por solução saturada de LiCl em etanol, e amostrador automático 814 USB Sample Processor (Metrohm).

3.1.8. Estabilidade Oxidativa

A estabilidade oxidativa é expressa pelo período de indução, que foi obtido, em triplicata, a partir do método Rancimat descrito na norma BS EN 14112 (2016). As amostras de óleo vegetal e de biodiesel foram expostas a 110 °C e fluxo de ar de 10 L h⁻¹ para oxidação induzida, utilizando o equipamento 873 Biodiesel Rancimat (Metrohm), que também mede a condutividade na cela coletora dos voláteis resultantes da oxidação.

3.1.9. Teor de Água

A análise do teor de água das amostras foi realizada em triplicata a partir do método ASTM D6304-07 (2007), utilizando o titulador Karl Fischer Coulométrico 831 KF (Metrohm).

3.1.10. Tratamento dos Dados

A calibração multivariada foi realizada por PLS, utilizando o *software Pirouette* 4.5. Para a construção dos modelos PLS, ambos os tipos de espectros foram centrados na média como pré-processamento. Já os pré-tratamentos foram diferentes para cada técnica. Para os espectros de IV, foi excluída a parte relacionada ao CO₂ atmosférico e para os de RMN ¹H foram excluídas as partes relacionadas ao solvente e ao TMS, pois tais regiões não trazem informações das amostras. Além disso, ambos os tipos de espectros foram normalizados e foram obtidas suas primeiras derivadas.

3.1.11. Degradação do Óleo de Soja e do seu Biodiesel

Amostras de óleo de soja e de biodiesel metílico proveniente deste óleo foram submetidas a 110 °C e fluxo de ar de 10 L h⁻¹, por 19 horas, no equipamento

873 Biodiesel Rancimat (Metrohm). A degradação das amostras foi acompanhada por espectros de RMN ^1H , de IV médio e pelo índice de iodo, obtido pelo método de Wijs, BS EN 14111 (2003a).

O estudo da degradação foi realizado com óleo de soja e seu biodiesel metílico, pois o óleo de soja representa a principal matéria prima para a produção de biodiesel no Brasil (PORTAL BRASIL, 2017).

3.2. Quantificação de Metanol Residual em Biodiesel

3.2.1. Amostras

Foram utilizados biodieseis provenientes de diferentes óleos vegetais, tais como babaçu, canola, macaúba, milho, óleo residual de fritura e soja. Os óleos foram adquiridos no mercado local de Campinas-SP e o óleo residual de fritura foi doado por um restaurante da mesma cidade.

3.2.2. Método da Adição de Padrão (AP) por RMN ^1H

Metanol absoluto (99,8%, Synth) foi adicionado a cada amostra de biodiesel nas seguintes concentrações aproximadas: 0%, 0,05%, 0,10%, 0,15%, 0,20% e 0,25% m/m para uma massa final de 5 g de mistura biodiesel/metanol, medida em balança analítica (Quimis). As amostras foram vigorosamente agitadas em agitador para tubos Vortex (DragonLab) para a obtenção dos espectros de RMN ^1H .

3.2.3. Método do Padrão Interno (PI) por RMN ^1H

Éter metil terc-butílico (99,7%, Vetec) foi adicionado a cada amostra de biodiesel em uma concentração conhecida, aproximadamente 0,10% m/m, para uma massa final de aproximadamente 5 g de mistura biodiesel/éter, medida em balança analítica (Quimis). As amostras foram vigorosamente agitadas em agitador para tubos Vortex (DragonLab) para a obtenção dos espectros de RMN ^1H .

3.2.4. Espectros de RMN ^1H

Para a obtenção dos espectros de RMN ^1H , 200 μL de cada amostra foram dissolvidos em 600 μL de CDCl_3 , contendo TMS, e os espectros foram obtidos, em triplicata, no espectrômetro de RMN Bruker Avance III 500 MHz. Foram utilizadas as seguintes condições experimentais: sequência de pulso zg30, janela espectral de -4,00 a 16,00 ppm, espectro com 32768 pontos, pulso de 90° calibrado de 11,75 μs , intervalo entre os pulsos de 5 s e 16 varreduras.

3.2.5. Método por Cromatografia em Fase Gasosa (BS EN 14110)

O método por cromatografia em fase gasosa para a quantificação de metanol em biodiesel foi realizado de acordo com as condições previstas na norma BS EN 14110 (2003b), utilizando um cromatógrafo a gás Agilent 6890N.

As amostras de biodiesel foram aquecidas, durante 45 minutos, a 80°C em frascos hermeticamente fechados para permitir a dessorção do metanol contido na solução para a fase gasosa. Quando o equilíbrio foi atingido, uma parte da fase de gás foi inserida no cromatógrafo, onde o metanol foi detectado por ionização em chama.

A quantidade de metanol foi calculada por referência a uma calibração externa. Três soluções foram utilizadas para a calibração, com aproximadamente as seguintes concentrações de metanol: 0,5%, 0,1% e 0,01% m/m de metanol em biodiesel de referência (teor de metanol inferior a 0,001% m/m).

3.3. Quantificação de Biodiesel em Blendas Diesel-Biodiesel

3.3.1. Amostras

Para este estudo, foram utilizados biodiesel de soja e diesel S10, doado pela Refinaria de Paulínia (REPLAN) – PETROBRAS. Utilizou-se biodiesel de soja, pois esta é a principal fonte vegetal para a produção de biodiesel no Brasil.

Para calibrar a concentração de biodiesel nas blendas diesel-biodiesel, misturas de diesel e biodiesel foram preparadas utilizando balões volumétricos de 5 mL. Variou-se a proporção de biodiesel nas blendas de acordo com as seguintes

concentrações: 1,0%, 3,0%, 5,0%, 7,0%, 9,0%, 11,0%, 13,0% e 15,0% v/v. Amostras externas contendo 6,0%, 8,0% e 10,0% v/v de biodiesel foram testadas para avaliar o método proposto.

Para calibrar o teor de biodiesel em blends adulteradas com óleo vegetal, misturas de diesel, biodiesel e óleo vegetal foram preparadas utilizando balões volumétricos de 5 mL. A proporção diesel manteve-se fixa em 90% v/v, e a outra proporção (10% v/v) foi variada em termos de biodiesel e óleo vegetal, de acordo com as seguintes concentrações: 10,0-0%, 9,0-1,0%, 8,0-2,0%, 7,0-3,0%, 6,0-4,0%, 5,0-5,0%, 4,0-6,0%, 3,0-7,0%, 2,0-8,0%, 1,0-9,0% e 0-10,0% v/v.

3.3.2. Espectros na Região do UV-Vis

Os espectros UV-Vis foram obtidos, em triplicata, no espectrômetro Agilent 5000 Cary. Para obter os espectros, cubetas de quartzo foram preenchidas com 3 mL de cada amostra e uma cubeta de quartzo foi preenchida com 3 mL de diesel para atuar como branco. Foram utilizadas as seguintes condições experimentais: janela espectral de 190 a 700 nm e resolução espectral 1 nm.

3.3.3. Espectros de RMN ¹H

Para a obtenção dos espectros de RMN ¹H, 200 µL de cada biodiesel foram dissolvidos em 600 µL de CDCl₃, contendo TMS, e os espectros foram obtidos, em triplicata, no espectrômetro de RMN Bruker Avance III 600 MHz. Foram utilizadas as seguintes condições experimentais: sequência de pulso zg30, janela espectral de -4,00 a 16,00 ppm, espectro com 32768 pontos, pulso de 90° calibrado de 13,15 µs, intervalo entre pulsos de 5 s e 16 varreduras.

3.3.4. Método por Espectroscopia no IV (BS EN 14078)

O método por espectroscopia no IV médio foi realizado de acordo com a norma BS EN 14078 (2014a), utilizando o espectrômetro FTIR Agilent Cary 630. Cada blenda foi aplicada como um filme entre duas celas de NaCl e os espectros na região do IV médio foram obtidos em triplicata. Foram utilizadas as seguintes

condições experimentais: janela espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , resolução espectral de 2 cm^{-1} e 64 varreduras.

A concentração de biodiesel na blenda foi calculada por referência a uma calibração externa. Cinco soluções com concentrações conhecidas de biodiesel na blenda foram utilizadas para a calibração. A construção da curva analítica baseia-se na absorvância medida em aproximadamente 1745 cm^{-1} , relacionada ao pico de absorção da carbonila de ésteres. Este pico está presente nos espectros de biodiesel e ausente nos de diesel de petróleo.

3.3.5. Tratamento dos Dados

A calibração multivariada foi realizada por PLS, utilizando o software *Pirouette* 4.5. Como pré-processamento, os espectros foram centrados na média.

CAPÍTULO 4:
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise “Screening” e Estabilidade de Óleo Vegetal e de Biodiesel

4.1.1. Espectros na região do IV e de RMN ^1H

A Figura 4 apresenta a atribuição das principais absorções observadas nos espectros de IV das amostras de óleo vegetal e de biodiesel, exemplificada a partir de um espectro de óleo de girassol. No espectro há um destaque para a região relacionada às vibrações do CO_2 atmosférico, a qual foi desconsiderada na construção dos modelos, por não trazer informações relacionadas às amostras.

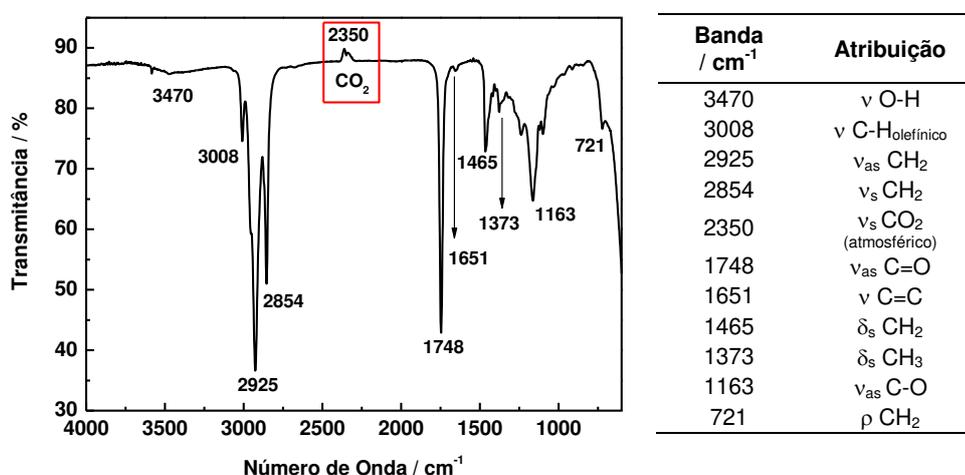


Figura 4. Atribuição das absorções observadas nos espectros de IV, exemplificada a partir de um espectro de óleo de girassol.

Um espectro de IV não somente permite a análise qualitativa dos compostos orgânicos, como também pode atuar como uma impressão digital de uma amostra. Os modos vibracionais são influenciados pelos grupos funcionais vizinhos, assim, um espectro de IV contém mais informação do que apenas os valores de absorção. Além disso, é uma ferramenta amplamente utilizada para a análise quantitativa (RUSCHEL *et al.*, 2014; CASTILHO-ALMEIDA *et al.*, 2012).

No contexto das amostras de óleo vegetal e de biodiesel, os espectros de IV podem sofrer variações relacionadas, principalmente, com as bandas correspondentes às insaturações e, também, com as relacionadas ao tamanho da cadeia carbônica do éster. Além disso, a banda próxima a 3400 cm^{-1} pode indicar a presença e a quantidade de água ou ácidos carboxílicos nas amostras (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

A Figura 5 e a Tabela 2 apresentam, respectivamente, a atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN ^1H e a descrição dos diferentes hidrogênios presentes nas moléculas de triacilglicerol (TAG). Os óleos vegetais apresentam-se como uma mistura de moléculas de TAG, que podem conter diferentes cadeias de ésteres ligadas à estrutura do glicerol. Assim, na Figura 5, foi utilizada uma das possíveis estruturas para representar as moléculas de TAG e realizar a atribuição dos diferentes tipos de hidrogênios presentes nela.

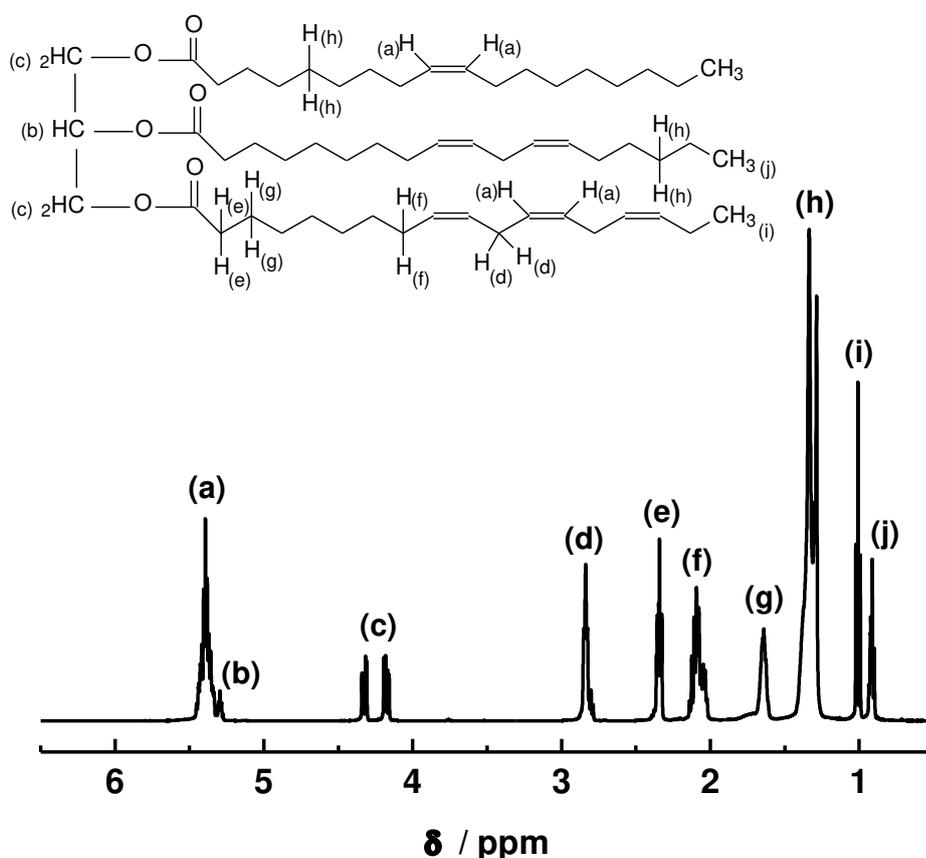


Figura 5. Atribuição dos hidrogênios no espectro de RMN ^1H , exemplificada a partir de um espectro de RMN ^1H de óleo de linhaça.

Utilizou-se um espectro de RMN ^1H de óleo de linhaça para exemplificar a atribuição, pois nele estão presentes os dez diferentes tipos de hidrogênio possíveis de serem observados em uma molécula de TAG (DE ANDRADE, 2011; MARTINI, 2010). Para alguns tipos de óleos, como girassol, castanha do Brasil, algodão e misto de gergelim, não foi observado o sinal em 0,99 ppm, relacionado aos hidrogênios metílicos da cadeia linolênica, para outros como canola, soja, milho,

gergelim e arroz este sinal foi observado com baixa ou moderada intensidade e já para os óleos de linhaça e linhaça dourada este sinal mostra-se com acentuada presença. Isto já demonstra diferença na composição dos tipos de ésteres ligados à estrutura do glicerol e oferece uma ideia da proporção da presença da cadeia linolênica nos diferentes óleos estudados.

Tabela 2. Descrição dos hidrogênios atribuídos no espectro de RMN ¹H.

H	δ / ppm	Descrição
(a)	5,40	Hidrogênios olefínicos
(b)	5,26	Hidrogênio metínico H-2 do glicerol
(c)	4,30 e 4,15	Hidrogênios metilênicos H-1 e H-3 do glicerol
(d)	2,80	Hidrogênios alílicos internos
(e)	2,31	Hidrogênios α-carboxílicos
(f)	2,00	Hidrogênios alílicos externos
(g)	1,61	Hidrogênios β-carboxílicos
(h)	1,30	Hidrogênios metilênicos das cadeias lineares dos ésteres
(i)	0,99	Hidrogênios metílicos da cadeia linolênica
(j)	0,88	Hidrogênios metílicos dos demais ésteres

A presença e a proporção da cadeia linolênica na amostra devem afetar diversas propriedades físico-químicas e parâmetros de qualidade dos óleos. Esta é uma cadeia poli-insaturada, o que resulta na presença de hidrogênios alílicos externos e internos e maior quantidade de hidrogênios olefínicos. Estas características devem influenciar as interações intermoleculares e facilitar reações de oxidação lipídica, que podem iniciar-se com a retirada de um hidrogênio alílico (YAAKOB *et al.*, 2014; FARMER *et al.*, 1942). Como resultado, parâmetros como massa específica, viscosidade, estabilidade oxidativa, dentre outros podem sofrer influência da presença e da quantidade da cadeia linolênica.

Após a reação de transesterificação para a formação de biodiesel, a composição deste biocombustível será dada pelas diferentes cadeias que estavam ligadas à estrutura do glicerol nos triacilgliceróis. Por isto, a composição do biodiesel, em termos das cadeias carbônicas, será extremamente influenciada pela fonte vegetal do óleo utilizado na sua síntese.

A Figura 6 apresenta as principais diferenças entre um óleo e seu biodiesel metílico nos espectros de IV e RMN ¹H, ilustradas a partir das amostras de soja.

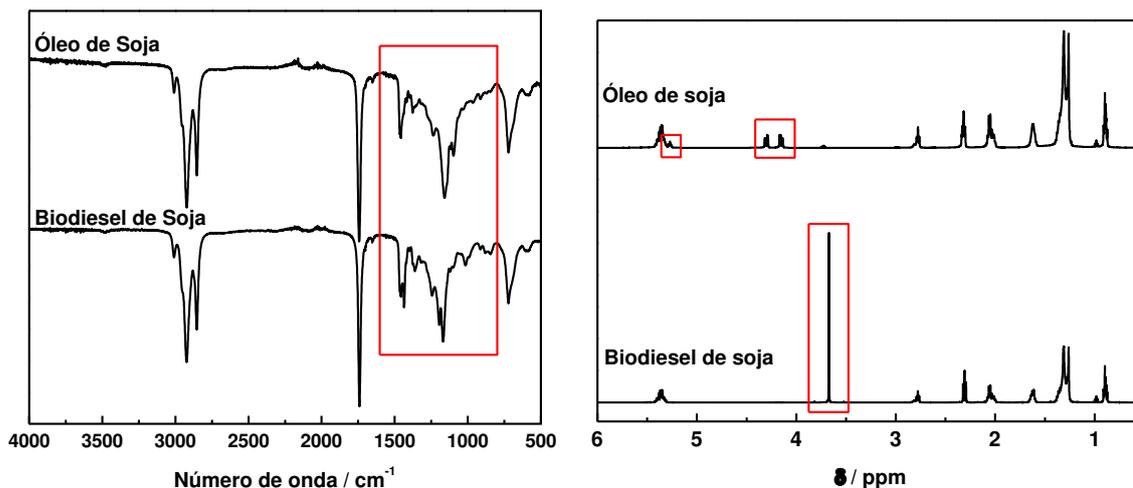


Figura 6. Principais diferenças entre o óleo de soja e seu biodiesel metílico nos espectros de IV e RMN ¹H.

No espectro de IV, a região que mais diferencia o óleo em relação ao seu biodiesel é a região de 1000 a 1500 cm⁻¹. Essa região pode ser considerada a impressão digital em forma de espectro de absorção no IV, isto porque ela inclui várias bandas acopladas e sofre maior variação dos sinais em relação ao tipo de óleo ou biodiesel (RUSCHEL *et al.*, 2014; CASTILHO-ALMEIDA *et al.*, 2012).

A conversão de TAG para monoalquil ésteres é mais facilmente notada nos espectros de RMN ¹H, quando comparados aos espectros de IV. Isso porque nos espectros de RMN ¹H ocorre o desaparecimento dos hidrogênios relacionados à estrutura do glicerol dos TAG: os duplos dupletos referentes aos hidrogênios dos grupos CH₂ (4,30 e 4,15 ppm), assim como o sinal do hidrogênio do grupo CH (5,26 ppm). Além disso, há o surgimento do singleto em 3,66 ppm referente aos hidrogênios do CH₃ do grupo metóxi do biodiesel, oriundo do metanol (SILVA *et al.*, 2015).

4.1.2. Análise “Screening” de Óleo Vegetal e de Biodiesel

Os resultados obtidos para os seis parâmetros de qualidade dos óleos vegetais e dos biodieseis analisados estão apresentados respectivamente nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Resultados obtidos para os parâmetros estudados dos óleos vegetais (n=3)^a.

Óleo	Período de Indução / h	Teor de água / mg kg ⁻¹	Viscosidade Cinemática a 40°C / mm ² s ⁻¹	Massa Específica a 20°C / kg m ⁻³	Índice de Iodo / g I ₂ (100 g) ⁻¹	Índice de Acidez / mg KOH g ⁻¹
Algodão	5,8 ± 0,1	(14 ± 2) × 10 ¹	34,1 ± 0,3	917,2 ± 0,1	121 ± 4	0,30 ± 0,02
Arroz	6,6 ± 0,1	(36 ± 1) × 10 ¹	37,1 ± 0,4	919,0 ± 0,1	104 ± 2	0,15 ± 0,01
Canola	9,6 ± 0,1	(42 ± 4) × 10 ¹	34,42 ± 0,01	916,3 ± 0,2	113 ± 4	0,12 ± 0,01
Castanha do Brasil	7,7 ± 0,1	(99 ± 9) × 10 ¹	35 ± 1	910,4 ± 0,2	97 ± 4	4,12 ± 0,01
Gergelim	4,9 ± 0,5	(72 ± 3) × 10 ¹	33,1 ± 0,5	919,1 ± 0,1	114 ± 2	1,19 ± 0,01
Girassol	5,9 ± 0,1	(43 ± 1) × 10 ¹	31,2 ± 0,1	916,2 ± 0,3	130 ± 5	0,24 ± 0,01
Linhaça	3,2 ± 0,1	(79 ± 1) × 10 ¹	21,8 ± 0,1	927,1 ± 0,1	177 ± 1	2,44 ± 0,06
Linhaça Dourada	1,7 ± 0,1	(45 ± 1) × 10 ¹	23,2 ± 0,2	923,3 ± 0,1	187 ± 3	1,02 ± 0,01
Milho	12,0 ± 0,2	(55 ± 3) × 10 ¹	36,20 ± 0,01	915,3 ± 0,1	118 ± 4	0,12 ± 0,01
Misto de Gergelim	10,6 ± 0,1	(76 ± 7) × 10 ¹	31,9 ± 0,2	916,4 ± 0,1	111 ± 5	13,16 ± 0,03
Soja	7,6 ± 0,1	(54 ± 4) × 10 ¹	33,12 ± 0,09	913,5 ± 0,1	130 ± 6	0,61 ± 0,01

a = Os resultados estão apresentados com os algarismos significativos e/ou a precisão definidos pelas normas descritas na Parte Experimental.

Tabela 4. Resultados obtidos para os parâmetros estudados dos biodieseis (n=3)^a.

Biodiesel	Período de Indução / h	Teor de água / mg kg ⁻¹	Viscosidade Cinemática a 40°C / mm ² s ⁻¹	Massa Específica a 20°C / kg m ⁻³	Índice de Iodo / g I ₂ (100 g) ⁻¹	Índice de Acidez / mg KOH g ⁻¹
Algodão	3,1 ± 0,1	(62 ± 3) × 10 ¹	4,510 ± 0,009	879,3 ± 0,1	109 ± 1	0,16 ± 0,01
Babaçu	10,2 ± 0,3	178 ± 6	2,713 ± 0,006	868,1 ± 0,1	15 ± 1	0,67 ± 0,01
Canola	9,2 ± 0,3	(27 ± 2) × 10 ¹	5,43 ± 0,04	878,0 ± 0,2	106 ± 1	0,22 ± 0,02
Fritura	1,6 ± 0,1	(39 ± 1) × 10 ¹	4,616 ± 0,007	888,0 ± 0,2	114 ± 1	0,17 ± 0,01
Gergelim	8,7 ± 0,1	(8 ± 2) × 10 ¹	4,240 ± 0,001	879,1 ± 0,1	105 ± 1	0,11 ± 0,01
Girassol	2,1 ± 0,1	233 ± 6	4,718 ± 0,008	885,9 ± 0,1	123 ± 1	0,22 ± 0,01
Linhaça	1,9 ± 0,1	193 ± 6	3,61 ± 0,04	884,4 ± 0,1	151 ± 6	0,12 ± 0,01
Macaúba	61 ± 6	(19 ± 2) × 10 ¹	3,003 ± 0,004	869,4 ± 0,2	30 ± 2	0,20 ± 0,01
Microalga ^b	7,6 ± 0,1	198 ± 8	4,660 ± 0,006	878,2 ± 0,1	107 ± 1	0,15 ± 0,01
Milho	7,1 ± 0,1	277 ± 7	4,45 ± 0,03	879,1 ± 0,1	115 ± 1	0,19 ± 0,01
Palma	55 ± 3	394 ± 5	3,44 ± 0,02	873,2 ± 0,1	20 ± 1	0,24 ± 0,01
Soja	6,2 ± 0,4	249 ± 4	4,38 ± 0,01	883,6 ± 0,1	124 ± 1	0,20 ± 0,01

a = Os resultados estão apresentados com os algarismos significativos e/ou a precisão definidos pelas normas descritas na Parte Experimental.

b = Biodiesel de fonte não vegetal, microalgas pertencem ao reino dos Protistas.

Considerou-se a possibilidade de haver correlações entre esses parâmetros e isto foi verificado plotando-se um parâmetro contra outro, dois a dois. Entretanto, não foi observada nenhuma correlação direta entre eles. Neste contexto, buscaram-se, então, correlações entre os parâmetros e os espectros de IV e RMN ^1H . A composição dos diferentes ésteres presentes nos óleos vegetais e nos biodieséis pode ser diferenciada pelas referidas técnicas e correlacionadas com os parâmetros avaliados. Essas diferenças são notadas principalmente pela presença de insaturações, pelo posicionamento delas nas moléculas e pelo tamanho da cadeia dos ésteres.

Para obter as correlações entre os parâmetros e espectros de IV e RMN ^1H , aplicou-se a ferramenta quimiométrica PLS. As Figuras de 7 a 10 apresentam os valores de referência \times valores previstos pela calibração e pela validação cruzada dos modelos IV-PLS para óleos (Figura 7), RMN ^1H -PLS para óleos (Figura 8), IV-PLS para biodiesel (Figura 9) e RMN ^1H -PLS para biodiesel (Figura 10).

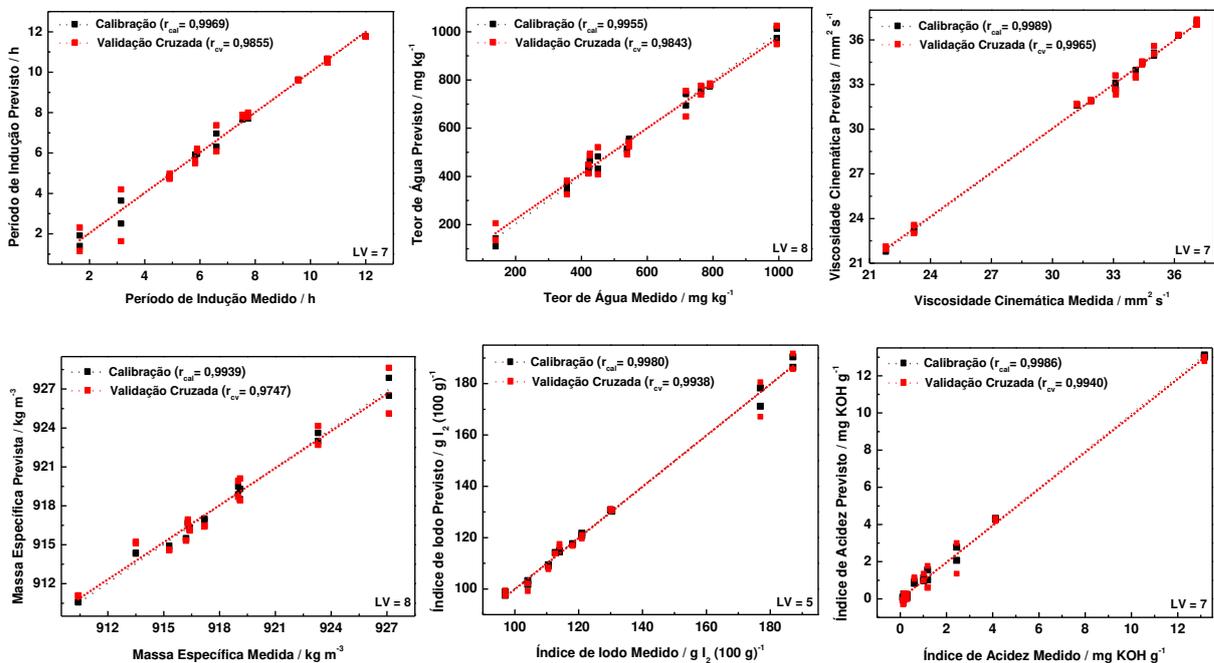


Figura 7. Valores de referência \times valores previstos para os modelos IV-PLS que determinam: período de indução, teor de água, viscosidade cinemática, massa específica, índices de iodo e acidez para óleo vegetal.

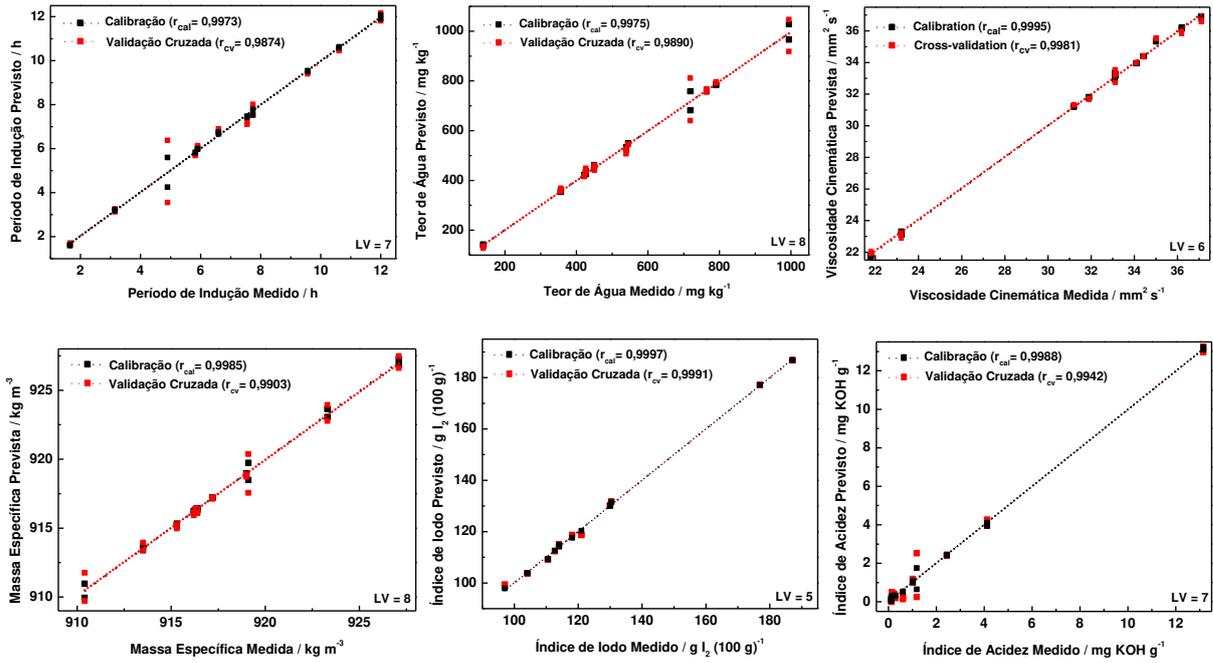


Figura 8. Valores de referência \times valores previstos para os modelos RMN ¹H–PLS que determinam: período de indução, teor de água, viscosidade cinemática, massa específica, índices de iodo e acidez para óleo vegetal.

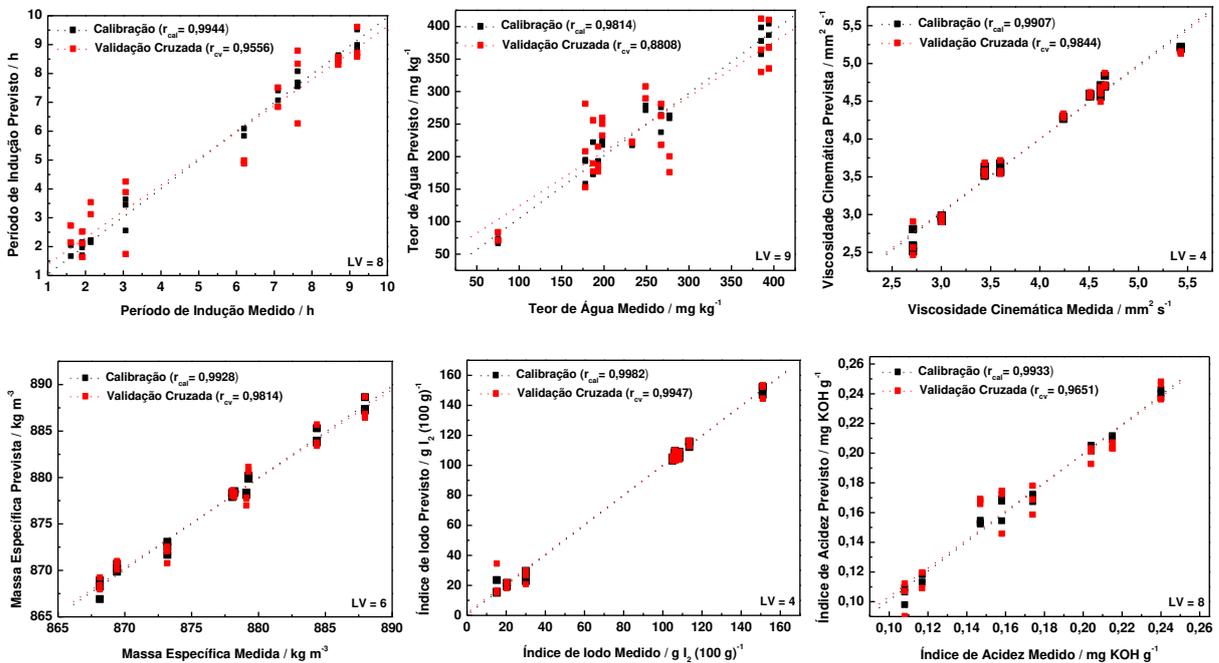


Figura 9. Valores de referência \times valores previstos para os modelos IV–PLS que determinam: período de indução, teor de água, viscosidade cinemática, massa específica, índices de iodo e acidez para biodiesel.

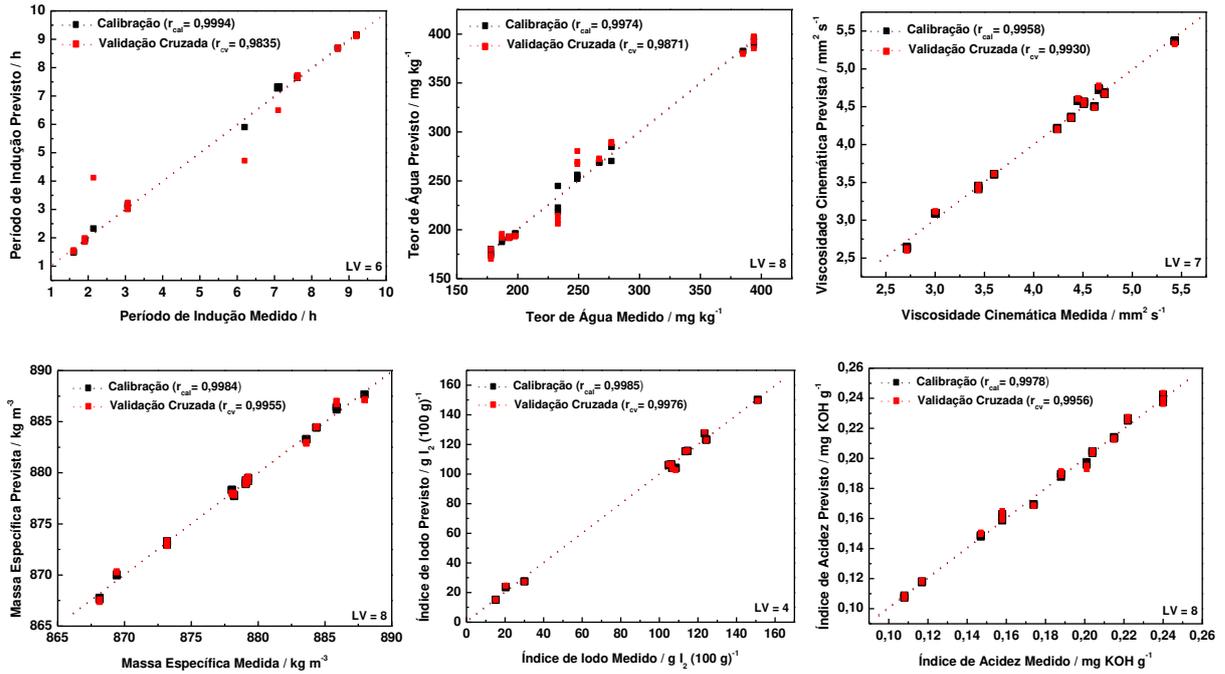


Figura 10. Valores de referência \times valores previstos para os modelos RMN ¹H-PLS que determinam: período de indução, teor de água, viscosidade cinemática, massa específica, índices de iodo e acidez para biodiesel.

De forma geral, a partir dos resultados obtidos, notam-se calibrações adequadas dos parâmetros para ambos os tipos de espectros, com valores de r_{cal} e r_{cv} que indicam acentuadas correlações entre os espectros e os parâmetros de óleos vegetais e de biodieseis.

Nove espectros, de três variedades de óleo ou biodiesel em triplicatas, que não foram utilizados na construção dos modelos, foram testados como amostras externas para avaliar a capacidade de previsão dos modelos. As Tabelas 5 e 6 apresentam os erros relativos obtidos para as amostras externas, respectivamente, para os modelos IV-PLS e RMN ¹H-PLS.

A partir dos resultados das Tabelas 5 e 6, é possível observar um melhor desempenho dos modelos que determinam a viscosidade, a massa específica e o índice de iodo. Esses parâmetros estão mais diretamente relacionados aos compostos majoritários do biodiesel (ésteres metílicos) e por isto revelaram-se mais fáceis para calibrar, validar internamente e prever amostras externas.

O período de indução é um parâmetro que não depende exclusivamente da estrutura dos ésteres. Impurezas oriundas da síntese do biodiesel, como por exemplo, o álcool, ou a presença de íons metálicos ou outros compostos orgânicos podem influenciar na estabilidade oxidativa, mesmo em baixas concentrações (CANHA *et al.*, 2012). Já a água e os ácidos graxos podem ser detectados e diferenciados dos ésteres metílicos pelos espectros de IV e RMN ^1H (SIMPSON, 2008; SILVERSTEIN *et al.*, 2005), entretanto, estão presentes nas amostras em concentrações baixas. A especificação do biodiesel em relação ao teor de água, segundo a ANP (2014), por exemplo, é da ordem de miligrama de água por quilograma de biodiesel. Nesse contexto, acredita-se que por estes motivos os modelos para determinar o período de indução, o teor de água e o índice de acidez apresentaram alguns valores com erros relativos superiores a 10% na previsão de amostras externas.

Tabela 5. Valores previstos (V_p), valores de referências (V_r) e erro relativo para os seis parâmetros analisados para as amostras externas, a partir do modelo IV–PLS.

Amostra		Período de Indução / h			Teor de água / mg kg ⁻¹			Viscosidade Cinemática / mm ² s ⁻¹		
		V_p	V_r	Erro Relativo (%)	V_p	V_r	Erro Relativo (%)	V_p	V_r	Erro Relativo (%)
Óleo	Algodão	5,8	5,8	0	97	139	30	34,1	34,1	0
	Arroz	5,9	6,6	11	314	356	12	36,8	37,1	0,8
	Gergelim	4,9	4,9	0	687	718	4	33,3	33,1	0,6
Biodiesel	Girassol	3,5	2,1	67	241	233	3	4,916	4,718	4
	Milho	6,5	7,1	8	228	277	18	4,29	4,45	4
	Soja	4,6	6,2	26	268	249	8	4,66	4,38	6
Amostra		Massa Específica a 20°C / kg m ⁻³			Índice de Iodo / g I ₂ (100 g) ⁻¹			Índice de Acidez / mg KOH g ⁻¹		
		V_p	V_r	Erro Relativo (%)	V_p	V_r	Erro Relativo (%)	V_p	V_r	Erro Relativo (%)
Óleo	Algodão	916,7	917,2	0,06	120	121	0,8	0,27	0,30	10
	Arroz	919,0	919,0	0	105	104	1	-0,07	0,15	147
	Gergelim	918,3	919,1	0,09	115	114	0,9	1,14	1,19	4
Biodiesel	Girassol	880,7	885,9	0,6	122	123	1	0,20	0,22	9
	Milho	877,7	879,1	0,2	110	115	5	0,13	0,19	32
	Soja	882,7	883,6	0,1	124	124	0	0,18	0,20	10

Tabela 6. Valores previstos (V_p), valores de referências (V_r) e erro relativo para os seis parâmetros analisados para as amostras externas, a partir do modelo RMN ^1H -PLS.

Amostra		Período de Indução / h			Teor de água / mg kg ⁻¹			Viscosidade Cinemática / mm ² s ⁻¹		
		V_p	V_r	Erro Relativo (%)	V_p	V_r	Erro Relativo (%)	V_p	V_r	Erro Relativo (%)
Óleo	Algodão	5,9	5,8	2	183	139	32	34,0	34,1	0,3
	Canola	9,5	9,6	1	444	422	5	34,28	34,42	0,4
	Misto	10,6	10,6	0	764	764	0	31,8	31,9	0,3
Biodiesel	Girassol	2,4	2,1	14	237	233	2	4,378	4,718	7
	Milho	7,3	7,1	3	276	277	0,4	4,63	4,45	4
	Soja	5,9	6,2	5	255	249	2	4,35	4,38	0,7
Amostra		Massa Específica a 20°C / kg m ⁻³			Índice de Iodo / g I ₂ (100 g) ⁻¹			Índice de Acidez / mg KOH g ⁻¹		
		V_p	V_r	Erro Relativo (%)	V_p	V_r	Erro Relativo (%)	V_p	V_r	Erro Relativo (%)
Óleo	Algodão	916,6	917,2	0,07	120	121	0,8	0,31	0,30	3
	Canola	915,9	916,3	0,04	113	113	0	0,12	0,12	0
	Misto	916,3	916,4	0,01	109	111	2	13,12	13,16	0,3
Biodiesel	Girassol	884,4	885,9	0,2	127	123	3	0,17	0,20	15
	Milho	881,6	879,1	0,3	115	115	0	0,20	0,19	5
	Soja	887,3	883,6	0,4	121	124	2	0,18	0,22	18

Para avaliar o desempenho dos modelos, foram calculados os parâmetros: raiz quadrada do erro médio quadrático (RMSE do inglês, *Root Mean Squared Error*) de calibração (RMSEC), de validação cruzada (RMSECV) e de previsão (RMSEP). A Equação 3 representa a equação geral dos erros, na qual \hat{y}_i representa o valor previsto pelo modelo multivariado, y_i representa o valor de referência e n corresponde ao número de amostras (FERREIRA *et al.*, 1999). Todos esses parâmetros estão apresentados nas Tabelas 7 e 8, onde também estão expressos os valores de r_{cal} e r_{cv} , LV e as faixas de trabalho das calibrações para cada modelo IV-PLS e RMN ^1H -PLS.

O número de LV a ser utilizado em um modelo é de fundamental importância nos resultados a serem obtidos. A utilização de poucas LV poderá fornecer resultados não satisfatórios, uma vez que pouca informação disponível dos dados originais estará sendo utilizada, ao passo que, se for utilizada uma quantidade

muito grande de LV, ocorrerá a modelagem de ruídos, podendo ocasionar maiores erros para a previsão de amostras.

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (\text{Equação 3})$$

Em que: RMSE = Raiz quadrada do erro médio quadrático;

\hat{y}_i = Valor previsto pelo modelo multivariado;

y_i = Valor referência;

n = Número de amostras.

A escolha do número de LV foi realizada baseando-se nos valores de RMSECV. O cálculo desse parâmetro foi realizado para modelos que utilizam desde 1 até 19 LV, e os resultados de RMSECV são apresentados em um gráfico em função do número de LV. A Figura 11 exemplifica este gráfico, a partir dos resultados para os modelos multivariados que determinam o período de indução de óleo vegetal e de biodiesel.

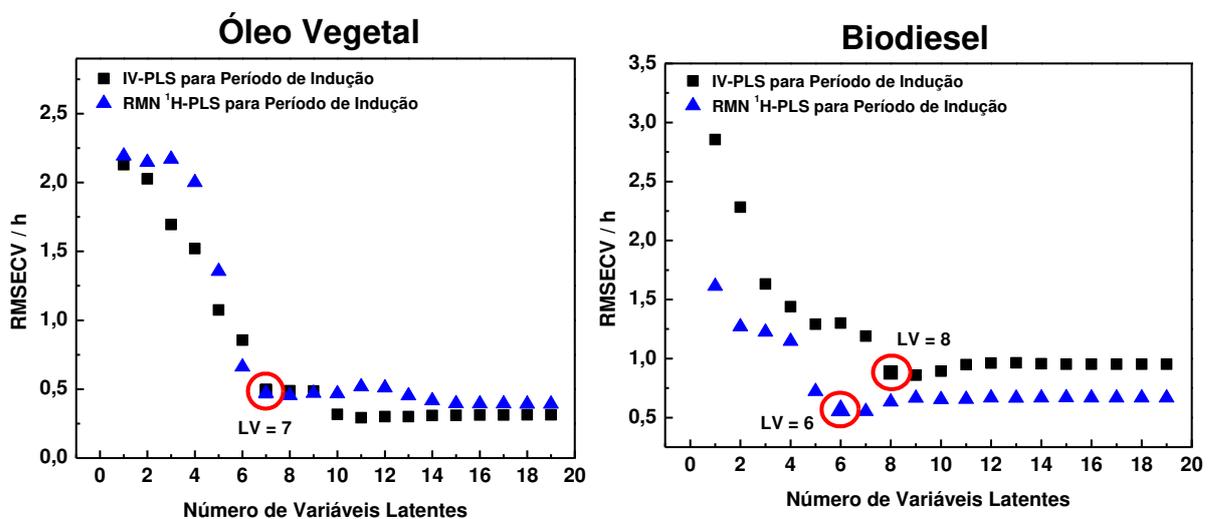


Figura 11. Valores de RMSECV em função do número de variáveis latentes (LV) para os modelos IV-PLS e RMN ¹H-PLS, para a determinação do período de indução de óleo vegetal e de biodiesel.

O comportamento típico para esses gráficos é a observação de um mínimo ou um patamar, que indica a melhor dimensionalidade do modelo de regressão, ou seja, o melhor número de LV que produziu o menor erro de previsão.

Assim, nota-se na Figura 11 que para a determinação do período de indução, optou-se por 7 LV para os modelos IV-PLS e RMN ¹H-PLS de óleo vegetal e, respectivamente, 8 e 6 LV para os modelos IV-PLS e RMN ¹H-PLS de biodiesel. Essas escolhas foram realizadas, pois a partir dos valores citados, não há diminuição significativa do valor de RMSECV, por mais que se aumente o número de LV. A escolha do número de LV para os demais modelos foi realizada de forma análoga ao exemplo dado.

Tabela 7. Parâmetros dos modelos IV-PLS e RMN ¹H-PLS construídos para determinação dos seis parâmetros analisados nos óleos vegetais.

Parâmetro	Período de Indução	Teor de água	Viscosidade Cinemática	Massa Específica	Índice de lodo	Índice de Acidez
Faixa de trabalho	1,7 – 12,0 h	139 – 994 mg kg ⁻¹	21,8 – 37,1 mm ² s ⁻¹	910,4 – 927,1 kg m ⁻³	97 – 187 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,12 – 13,16 mg KOH g ⁻¹
Parâmetros do Modelo IV-PLS (Óleo Vegetal)						
LV	7	8	7	8	5	7
RMSEC	0,3 h	28 mg kg ⁻¹	0,3 mm ² s ⁻¹	0,6 kg m ⁻³	2 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,2 mg KOH g ⁻¹
r _{cal}	0,9969	0,9955	0,9989	0,9939	0,9980	0,9986
RMSECV	0,5 h	41 mg kg ⁻¹	0,4 mm ² s ⁻¹	1,0 kg m ⁻³	3 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,4 mg KOH g ⁻¹
r _{cv}	0,9855	0,9843	0,9965	0,9747	0,9938	0,9940
RMSEP	0,4 h	39 mg kg ⁻¹	0,3 mm ² s ⁻¹	0,6 kg m ⁻³	1 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,2 mg KOH g ⁻¹
Parâmetros do Modelo RMN ¹H-PLS (Óleo Vegetal)						
LV	7	8	6	8	5	7
RMSEC	0,3 h	21 mg kg ⁻¹	0,2 mm ² s ⁻¹	0,4 kg m ⁻³	1 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,2 mg KOH g ⁻¹
r _{cal}	0,9973	0,9975	0,9995	0,9985	0,9997	0,9988
RMSECV	0,5 h	34 mg kg ⁻¹	0,3 mm ² s ⁻¹	0,6 kg m ⁻³	1 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,4 mg KOH g ⁻¹
r _{cv}	0,9874	0,9890	0,9981	0,9903	0,9991	0,9942
RMSEP	0,1 h	33 mg kg ⁻¹	0,1 mm ² s ⁻¹	0,5 kg m ⁻³	1 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,1 mg KOH g ⁻¹

Os valores das Tabelas 7 e 8 revelam calibrações e validações adequadas para ambas as técnicas utilizadas. A partir destes resultados, propõe-se a aplicação dos modelos PLS (IV ou RMN ¹H) desenvolvidos na determinação dos parâmetros de qualidade de óleo vegetal e de biodiesel. Esses modelos permitem a

análise simultânea de seis parâmetros, reduzindo o tempo de análise, o consumo de reagentes e a geração de resíduos. Em outras palavras, com apenas um espectro, obtido por IV ou por RMN ^1H , é possível realizar uma análise “*screening*” abordando no mínimo seis importantes parâmetros de caracterização e/ou qualidade.

Em geral, a análise “*screening*” está relacionada com métodos que comumente envolvem pouco ou nenhum tratamento de amostra, com aquisição rápida de dados qualitativos, semiquantitativos, ou mesmo quantitativos sobre muitas características de uma amostra, a sua resposta é utilizada para a tomada de decisões e, muitas vezes, não é necessária uma confirmação por métodos convencionais.

Tabela 8. Parâmetros dos modelos IV–PLS e RMN ^1H –PLS construídos para determinação dos seis parâmetros analisados nos biodieseis.

Parâmetro	Período de Indução ^a	Teor de água ^b	Viscosidade Cinemática	Massa Específica	Índice de lodo	Índice de Acidez ^c
Faixa de trabalho	1,6 – 9,2 h	75 – 394 mg kg ⁻¹	2,713 – 5,43 mm ² s ⁻¹	868,1 – 888,0 kg m ⁻³	15 – 151 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,11 – 0,24 mg KOH g ⁻¹
Parâmetros do Modelo IV–PLS (Biodiesel)						
LV	8	9	4	6	4	8
RMSEC	0,4 h	22 mg kg ⁻¹	0,1 mm ² s ⁻¹	0,8 kg m ⁻³	3 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,006 mg KOH g ⁻¹
r _{cal}	0,9944	0,9814	0,9907	0,9928	0,9982	0,9933
RMSECV	0,9 h	44 mg kg ⁻¹	0,2 mm ² s ⁻¹	1 kg m ⁻³	5 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,01 mg KOH g ⁻¹
r _{cv}	0,9556	0,8808	0,9844	0,9814	0,9947	0,9651
RMSEP	1,2 h	31 mg kg ⁻¹	0,2 mm ² s ⁻¹	3 kg m ⁻³	3 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,04 mg KOH g ⁻¹
Parâmetros do Modelo RMN ^1H–PLS (Biodiesel)						
LV	6	8	7	8	4	8
RMSEC	0,1 h	6 mg kg ⁻¹	0,1 mm ² s ⁻¹	0,4 kg m ⁻³	3 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,003 mg KOH g ⁻¹
r _{cal}	0,9994	0,9974	0,9958	0,9984	0,9985	0,9978
RMSECV	0,6 h	12 mg kg ⁻¹	0,1 mm ² s ⁻¹	0,6 kg m ⁻³	3 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,004 mg KOH g ⁻¹
r _{cv}	0,9835	0,9871	0,9930	0,9955	0,9976	0,9956
RMSEP	0,2 h	8 mg kg ⁻¹	0,2 mm ² s ⁻¹	3 kg m ⁻³	3 g l ₂ (100 g) ⁻¹	0,03 mg KOH g ⁻¹

a = Para a construção do modelo, as amostras de biodiesel de babaçu, macaúba e palma foram excluídas por apresentarem valores de período de indução muito maiores em relação às outras amostras.

b = Para a construção do modelo, a amostra de biodiesel de algodão foi excluída por apresentar teor de água relativamente maior em relação às outras amostras.

c = Para a construção do modelo, a amostra de biodiesel de babaçu foi excluída por apresentar índice de acidez relativamente maior em relação às outras amostras.

Comparando-se as técnicas de IV e RMN ^1H , ambas se mostraram rápidas, simples e adequadas para a calibração multivariada dos seis parâmetros estudados, a partir do método PLS. O IV apresenta vantagens por ser uma técnica de menor custo para a aquisição do espectrômetro e menor custo de manutenção; entretanto, a partir da RMN ^1H é possível detectar mais facilmente a presença de possíveis impurezas e extrair mais informações de forma direta.

O índice de iodo necessitou de um número menor de LV para a construção do modelo, e por isto foi o único parâmetro possível de ser calibrado por calibração multivariada clássica (BARROS *et al.*, 2010), além da calibração por PLS, levando em consideração apenas os principais sinais de IV e RMN ^1H . Os resultados dessa calibração multivariada clássica foram publicados no artigo intitulado “*Simple methods via mid-IR or ^1H NMR spectroscopy for the determination of the iodine value of vegetable oils*”, no periódico **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 7, p. 1431-1437, 2015 (SHIMAMOTO *et al.*, 2015).

4.1.3. Degradação do Óleo de Soja e do seu Biodiesel

Durante o monitoramento da degradação das amostras, foi observada gradual diminuição no índice de iodo e alterações em regiões específicas tanto nos espectros de IV como nos de RMN ^1H para as duas amostras estudadas: óleo de soja e seu biodiesel metílico.

Com relação às principais alterações nos espectros de IV, notou-se aumento nas intensidades de absorbâncias dos sinais relacionados às vibrações dos grupos O-H ($\sim 3450\text{ cm}^{-1}$), C=O ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) e diminuição na absorbância do sinal referente à vibração do grupo C-H_(olefínico) ($\sim 3008\text{ cm}^{-1}$). Por outro lado, nos espectros de RMN ^1H houve uma diminuição das áreas relacionadas aos sinais dos hidrogênios olefínicos ($\sim 5,4\text{ ppm}$), assim como diminuições nas áreas dos sinais dos hidrogênios alílicos ($\sim 2,0\text{ ppm}$) e bisalílicos ($\sim 2,8\text{ ppm}$).

A Figura 12 mostra a variação do índice de iodo, do sinal em 5,4 ppm (H_{olefínicos}) do espectro de RMN ^1H e do sinal em 1700 cm^{-1} (C=O) do espectro de IV em função do tempo de exposição das amostras a $110\text{ }^\circ\text{C}$ e fluxo de ar de 10 L h^{-1} . Nota-se que o perfil dos gráficos apresentados na Figura 12 é o mesmo para ambas as amostras.

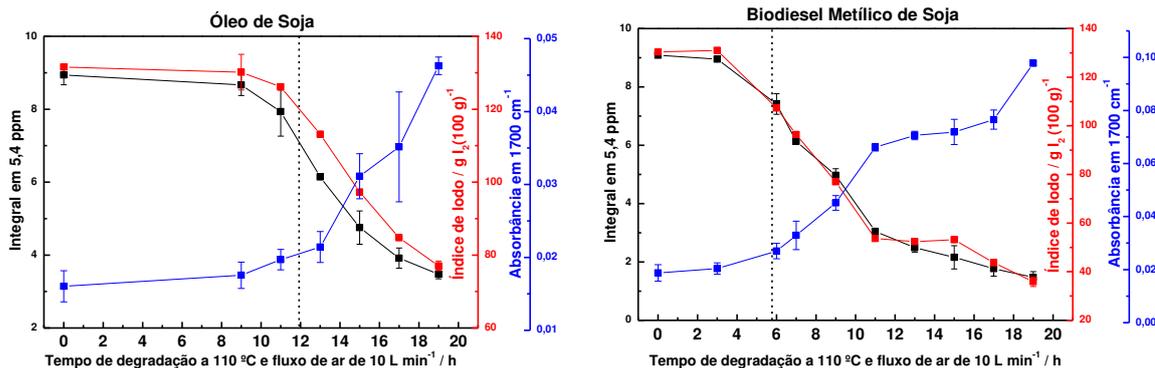


Figura 12. Monitoramento da degradação do óleo de soja e de seu biodiesel metílico pelo índice de iodo e por espectros de IV e RMN ^1H . Em que ---- representa o período de indução, obtido pelo método Rancimat.

Os gráficos da Figura 12 podem ser explicados a partir das reações de degradação que ocorrem nas amostras de óleo e de biodiesel, no fenômeno denominado auto-oxidação. Este fenômeno é bastante complexo e composto de reações radicalares capazes de se autopropagarem. Essa degradação é descrita por três etapas: iniciação, propagação e terminação e também sofre influência de ações catalíticas externas como temperatura, íons metálicos, radicais livres e pH (YAAKOB *et al.*, 2014; FRANKEL, 2005; SILVA *et al.*, 1999).

Na iniciação ocorre a formação de radicais livres dos ácidos graxos devido à perda de um hidrogênio de um carbono alílico (vizinho à dupla ligação), formando, assim, um sítio mais reativo frente às moléculas de oxigênio (YAAKOB *et al.*, 2014; KNOTHE, 2007). Isto pôde ser notado nos espectros de RMN ^1H pela diminuição das integrais dos sinais dos hidrogênios alílicos e bisalílicos.

Na propagação o radical alquil lipídico insaturado reage muito rapidamente com o oxigênio para formar radicais peroxil, que na sequência formam os hidroperóxidos através da transferência de outros hidrogênios alílicos. Essa é a oxidação que ocorre em cadeia e descreve o primeiro estágio da oxidação de lipídios insaturados produzindo peróxidos e hidroperóxidos como produtos primários (YAAKOB *et al.*, 2014; FRANKEL, 2005). Esta etapa pode ser observada pelo aumento nas intensidades de absorbâncias dos sinais relacionados às vibrações dos grupos OH nos espectros de IV, referentes aos hidroperóxidos formados.

Na terminação os radicais se acumulam podendo formar produtos não radicais (FRANKEL, 2005). Os hidroperóxidos lipídicos são relativamente estáveis à temperatura ambiente, entretanto, na presença de metais e temperaturas elevadas eles são facilmente decompostos em radicais alcóxi. Estes, na presença de oxigênio, formam aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, álcoois e hidrocarbonetos de cadeia menor (YAAKOB *et al.*, 2014; CHRISTENSEN & MCCORMICK, 2014; FRANKEL, 2005; HIATT *et al.*, 1968). Nesta última etapa é possível observar aumento na intensidade de absorbância do sinal relacionado à vibração do grupo C=O ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$), pela formação de aldeídos, cetonas ou ácidos, e diminuições na absorbância do sinal referente à vibração do grupo C-H_(olefínico) ($\sim 3008\text{ cm}^{-1}$) nos espectros de IV (SILVA *et al.*, 1999). Esta etapa também é caracterizada pelos espectros RMN ^1H , a partir da diminuição do sinal dos hidrogênios olefínicos, assim como pelo decréscimo do índice de iodo.

Com a ocorrência, em óleo e em biodiesel, dos processos oxidativos, ocorrem mudanças de suas propriedades físico-químicas como índice de acidez, densidade e viscosidade, com formação de sedimentos e de goma que provocam entupimento, deposição na câmara de combustão do motor e mau funcionamento de vários componentes do sistema de combustível (JOSHI *et al.*, 2013).

Pela análise dos gráficos da Figura 12, é possível observar que o biodiesel metílico foi mais facilmente degradado, em relação ao óleo de soja. O óleo é mais estável, em relação ao biodiesel, pois ele contém antioxidantes naturais e/ou adicionados que são removidos e/ou degradados durante a síntese do biodiesel.

Os óleos vegetais possuem, normalmente, componentes naturais com capacidade antioxidante como, por exemplo, tocoferóis. Assim, de modo semelhante, uma das formas mais empregadas para impedir a ocorrência da oxidação do biodiesel é a adição de substâncias químicas com capacidade antioxidante (GALVAN *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013; SERRANO *et al.*, 2013; KNOTHE, 2007). Esses aditivos aumentam, portanto, o período de indução do biodiesel e de suas blendas com diesel de petróleo, por inibir ou retardar os processos oxidativos (JOSHI *et al.*, 2013).

Os espectros de IV, de RMN ^1H e o índice de iodo revelaram-se adequados para o acompanhamento das reações de degradação de óleo e de biodiesel. Nesse contexto, ambas as técnicas instrumentais e o método clássico de

Wijs, que determina o índice de iodo, podem ser utilizados em estudos de avaliação de novos antioxidantes, para verificar a eficiência destes em retardar os processos de degradação oxidativa, assim como para verificar em qual das etapas esses antioxidantes atuam.

4.2. Quantificação de Metanol Residual em Biodiesel

4.2.1. Método da Adição de Padrão (AP) por RMN ^1H

A Figura 13(a) apresenta o espectro de RMN ^1H do biodiesel de soja e a Figura 13(b) é uma expansão da mesma no intervalo de 3,45 a 3,90 ppm para destacar os sinais utilizados no método da adição de padrão, isto é, o sinal do CH_3 do metanol (3,49 ppm) e os sinais do $^{13}\text{CH}_3$ provenientes do grupo metóxi do biodiesel.

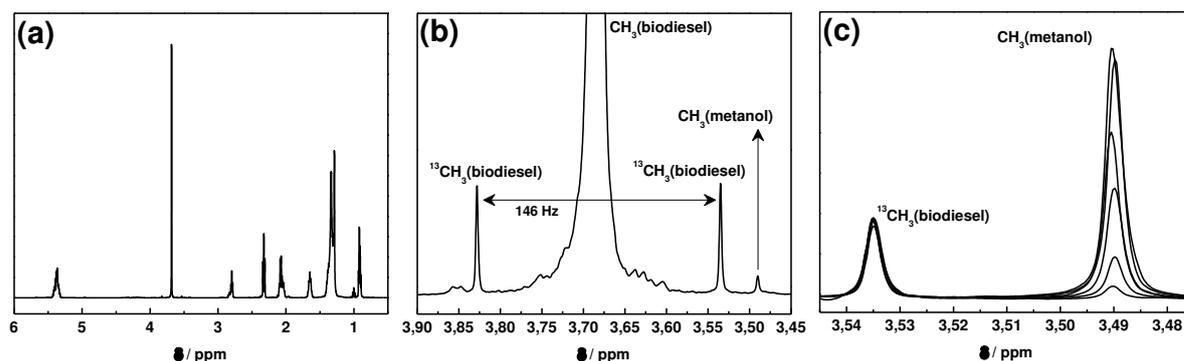


Figura 13. (a) Espectro de RMN ^1H do biodiesel de soja, (b) uma expansão de 3,45 a 3,90 ppm para destacar os principais sinais utilizados no método da adição de padrão e (c) espectros RMN ^1H do biodiesel de soja sem e com sucessivas adições de metanol.

Na Figura 13, é possível observar a baixa concentração do metanol no biodiesel, comparando a baixa intensidade do sinal do CH_3 do metanol com os sinais do biodiesel. O singlete do metanol é menor que os sinais satélites $^{13}\text{CH}_3$ do biodiesel, resultante do acoplamento entre ^{13}C (abundância natural 1,11% atômica) e os hidrogênios dos grupos metóxi do biodiesel.

Confirmou-se que o sinal em 3,49 ppm é o pertencente ao CH₃ do metanol, porque as adições de metanol aumentaram a integral relativa do referido singlete (Figura 13(c)).

As integrações dos sinais da Figura 13(c) foram obtidas: CH₃ do metanol (3,49 ppm) e um dos ¹³CH₃ do grupo metóxi do biodiesel (3,53 ppm) que não se alterou com as adições. A integral do sinal em 3,53 ppm foi normalizada para 1,00, obtendo-se uma integral relativa do sinal do metanol.

Em seguida, curvas analíticas foram construídas a partir da integral relativa do sinal do CH₃ do metanol e das concentrações de metanol adicionadas para cada amostra de biodiesel. Obteve-se um modelo descrito por uma equação de reta, e a concentração de metanol foi obtida por extrapolação da curva analítica para o eixo x, obtendo-se o valor em módulo. Considerando as curvas analíticas como $y = a + b x$, a concentração de metanol foi obtida pela Equação 4 (SKOOG *et al.*, 1996). A Figura 14 apresenta as curvas analíticas pelo método AP, para as amostras de biodiesel e suas equações.

$$C_{\text{metanol}} = \frac{a}{b} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que: C_{metanol} = concentração de metanol (% m/m);

a = intercepto;

b = coeficiente angular.

Os coeficientes angulares obtidos a partir das equações das curvas analíticas variaram de $12,6 \pm 0,2$ a $16,5 \pm 0,3$ (% m/m)⁻¹, o que indica diferentes valores de inclinação da reta. Essa variação indica o efeito da matriz (SKOOG, *et al.*, 1996), uma vez que o biodiesel é uma mistura complexa de diferentes ésteres e a sua composição depende da fonte (óleo vegetal). O efeito de matriz revela que a quantificação de metanol por RMN ¹H não pode ser realizada por calibração externa, porque diferentes tipos de biodiesel podem apresentar diferentes sensibilidades ao metanol.

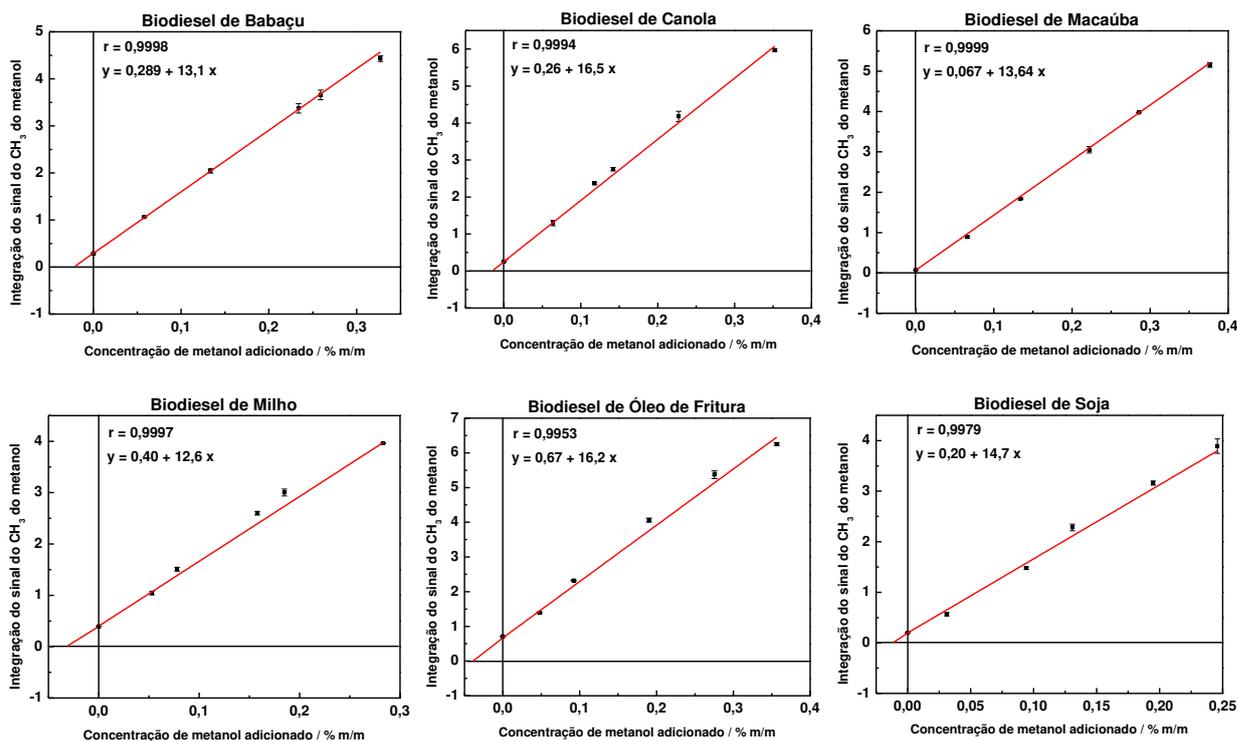


Figura 14. Curvas analíticas para a quantificação de metanol residual em biodiesel, pelo método da adição de padrão por RMN ^1H , para cada uma das seis amostras analisadas de biodiesel.

A perda de metanol por volatilização pode ser considerada desprezível durante a execução do método AP. O metanol apresenta ponto de ebulição de aproximadamente $65\text{ }^\circ\text{C}$ e interage com os ésteres do biodiesel via ligação de hidrogênio, como ilustrado na Figura 15. Esse tipo de interação intermolecular é relativamente forte e contribui para evitar a volatilização do metanol. Além disso, como apresentado na Parte Experimental do método por cromatografia gasosa (BS EN 14110), para que haja a dessorção do metanol contido na solução para a fase gasosa, a amostra de biodiesel deve ser aquecida a $80\text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 minutos.

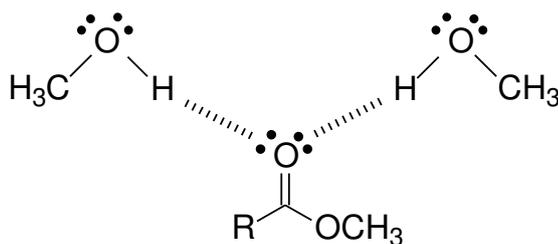


Figura 15. Representação das interações intermoleculares via ligação de hidrogênio entre metanol e éster metílico.

Os resultados da concentração de metanol pelo método AP por RMN ^1H para cada amostra de biodiesel estão apresentados na Tabela 9, comparados com os resultados obtidos pelo método do padrão interno e pelo método de cromatografia em fase gasosa (BS EN 14110).

4.2.2. Método do Padrão Interno (PI) por RMN ^1H

A Figura 16 apresenta o sinal do OCH_3 do padrão interno éter metil terc-butílico (3,23 ppm), ilustrado a partir de um espectro de RMN ^1H do biodiesel de milho. Este sinal está próximo ao sinal do metanol (3,49 ppm) e isolado de qualquer outro sinal do biodiesel. Foram obtidas as integrações de ambos os singletos da Figura 16. A integral do sinal em 3,23 ppm foi normalizada para 1,00 para facilitar os cálculos.

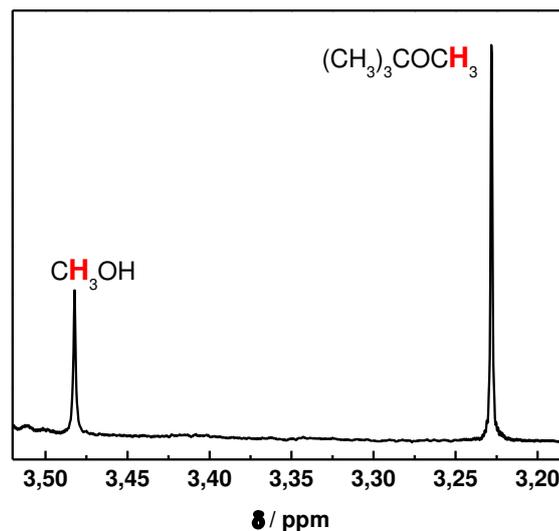


Figura 16. Espectro de RMN ^1H de biodiesel com éter metil terc-butílico como padrão interno para a quantificação de metanol.

A determinação da concentração de metanol pelo método do padrão interno por RMN ^1H é obtida pela Equação 5, isto é, a relação entre a concentração conhecida do éter, as integrais, e as massas molares dos compostos (metanol e éter metil terc-butílico) (SANTOS & COLNAGO, 2013).

$$C_{\text{metanol}} = C_{\text{éter}} \times \frac{I_{\text{CH}_3(\text{metanol})}}{I_{\text{OCH}_3(\text{éter})}} \times \frac{M(\text{metanol})}{M(\text{éter})} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que: C_{metanol} = concentração de metanol (% m/m);
 $C_{\text{éter}}$ = concentração de éter metil terc-butílico (% m/m);
 I_{CH_3} (metanol) = integral do sinal do metanol;
 I_{OCH_3} (éter) = integral do sinal do éter metil terc-butílico;
 $M(\text{metanol})$ = massa molar do metanol (32,04 g mol⁻¹);
 $M(\text{éter})$ = massa molar do éter metil terc-butílico (88,15 g mol⁻¹).

4.2.3. Comparação Estatística entre os Métodos

A Tabela 9 apresenta as concentrações de metanol obtidas pelo método de cromatografia em fase gasosa (BS EN 14110) e pelos métodos por RMN ¹H, isto é, adição de padrão e padrão interno, propostos neste trabalho para seis amostras diferentes de biodiesel.

Tabela 9. Concentração de metanol para as amostras de biodiesel analisadas pelos métodos BS EN 14110, AP por RMN ¹H e PI por RMN ¹H (n=3).

Biodiesel	Concentração de Metanol / % m/m		
	Método Cromatográfico BS EN 14110	Método da Adição de Padrão por RMN ¹ H	Método do Padrão Interno por RMN ¹ H
Babaçu	0,024 ± 0,002	0,0221 ± 0,0003	0,022 ± 0,001
Canola	0,0167 ± 0,0004	0,0158 ± 0,0007	0,0155 ± 0,0007
Macaúba	0,0057 ± 0,0001	0,0049 ± 0,0007	0,0053 ± 0,0003
Milho	0,0312 ± 0,0003	0,032 ± 0,002	0,0311 ± 0,0001
Óleo de Fritura	0,049 ± 0,001	0,041 ± 0,004	0,046 ± 0,003
Soja	0,0131 ± 0,0001	0,0136 ± 0,0008	0,0133 ± 0,0002

É possível observar na Tabela 9 que houve uma tendência de os métodos por RMN ¹H apresentarem resultados ligeiramente inferiores aos resultados obtidos por cromatografia gasosa. Assim, os teores de metanol obtidos pelos dois métodos propostos foram comparados estatisticamente com os resultados do método BS EN 14110. Foram utilizados o teste **t** de Student e o teste **F** para comparar os métodos. Os resultados estão na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados do teste **F** e do teste **t** de Student.

Biodiesel	BS EN 14110 × Método da Adição de Padrão por RMN ¹ H		BS EN 14110 × Método do Padrão Interno por RMN ¹ H	
	F	t	F	t
	Babaçu	44,44	1,33	4,00
Canola	3,06	1,58	3,06	2,10
Macaúba	49,00	1,60	9,00	1,79
Milho	44,44	0,56	9,00	0,45
Óleo de Fritura	16,00	2,74	9,00	1,34
Soja	64,00	0,88	4,00	1,26
Valor Crítico	99,00	2,78	19,00	2,78
(n ₁ = n ₂ = 3, v = 4)	(α = 0,01)	(α = 0,05)	(α=0,05)	(α = 0,05)

Os valores de **t** apresentados na Tabela 10 indicam que, ao nível de confiança de 95%, todos os resultados obtidos com os dois métodos propostos foram estatisticamente equivalentes aos resultados obtidos com o método BS EN 14110.

No que diz respeito à precisão, os resultados do teste **F** mostram precisão equivalente quando o método do padrão interno foi comparado com o método de cromatografia em fase gasosa, ao nível de confiança de 95%. Considerando-se o método da adição de padrão, os resultados mostram precisão equivalente em comparação com o método de cromatografia em fase gasosa ao nível de confiança de 99%.

As Tabelas 11 e 12 apresentam algumas figuras de mérito para os métodos propostos com RMN ¹H. Excelentes valores foram obtidos em termos de precisão (pelo desvio padrão relativo, DPR), bem como linearidade adequada ($r > 0,99$) para as curvas analíticas do método da adição de padrão. Em relação aos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), ambos os métodos propostos demonstraram valores favoráveis considerando que o limite máximo de metanol em biodiesel permitido pelas principais entidades reguladoras é de 0,20% m/m.

Tabela 11. Figuras de mérito do método da adição de padrão por RMN ¹H.

Biodiesel	Método da Adição de Padrão por RMN ¹ H				
	DPR / %	r	Sensibilidade / (% m/m) ⁻¹	LD / % (m/m)	LQ / % (m/m)
Babaçu	1,4	0,9998	13,1		
Canola	4,4	0,9994	16,5		
Macaúba	14,3	0,9999	13,6		
Milho	6,3	0,9997	12,6	0,0002	0,0005
Óleo de Fritura	9,8	0,9953	16,2		
Soja	5,9	0,9979	14,7		
Média	7,0	0,9987	14,5		

Tabela 12. Figuras de mérito do método do padrão interno por RMN ¹H.

Biodiesel	Método do Padrão Interno por RMN ¹ H		
	DPR / %	LD / % (m/m)	LQ / % (m/m)
Babaçu	4,5		
Canola	4,5		
Macaúba	5,7		
Milho	0,3	0,0001	0,0004
Óleo de Fritura	6,5		
Soja	1,5		
Média	3,8		

Para estimar o LD e o LQ para o método AP, como não há um branco, foi considerado o desvio padrão da amostra do biodiesel de macaúba, pois esta é a amostra com a concentração mais baixa de metanol. Assim, o LD e o LQ foram estimados multiplicando, respectivamente, a estimativa do desvio padrão indicada por 3,3 e por 10 e dividindo os resultados pela respectiva inclinação da curva analítica. Para o método do padrão interno, um branco foi simulado através da integração de regiões sem sinal, calculando-se o teor de metanol a partir destes dados. Portanto, neste caso, o LD e o LQ foram estimados a partir do valor do branco somado a sua estimativa do desvio padrão multiplicada por 3 e por 10, respectivamente, como descrito nas Equações 6 e 7 (MILLER & MILLER, 1993).

$$LD = \text{Branco} + 3 \times s_{\text{branco}}$$

(Equação 6)

$$LQ = \text{Branco} + 10 \times s_{\text{branco}} \quad (\text{Equação 7})$$

Em que: LD = Limite de detecção;

LQ = Limite de quantificação;

Branco = Resultado obtido para o branco;

s_{branco} = Estimativa do desvio padrão do branco.

Comparando-se os dados entre as Tabelas 11 e 12, é possível inferir que o método do padrão interno tende a ser mais preciso que o método da adição de padrão, devido aos seus menores valores de DPR. Além disso, o método do padrão interno, embora requeira éter metil terc-butílico como padrão interno, apresenta mais vantagens: um número menor de procedimentos é realizado porque não há necessidade de construção de curva analítica; e apenas um espectro de RMN ^1H é suficiente para quantificar o metanol residual em biodiesel. O menor número de procedimentos leva à redução do tempo de análise, e à diminuição do consumo de reagente, bem como à menor geração de resíduos.

Os métodos AP e PI por RMN ^1H para quantificação de metanol em biodiesel foram publicados no artigo intitulado “*Quantification of methanol in biodiesel through ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy*”, no periódico **Fuel**, v. 175, p. 99-104, 2016 (SHIMAMOTO & TUBINO, 2016).

4.3. Quantificação de Biodiesel em Blendas Diesel-Biodiesel

4.3.1. Método Univariado por UV-Vis

A Figura 17(a) mostra o gráfico dos valores absolutos das diferenças entre as absorvâncias das blendas e do diesel ($|A_{\text{blenda}} - A_{\text{diesel}}|$) de 190 a 700 nm, e a Figura 17(b) mostra uma expansão de 350 a 380 nm da Figura 17(a) para destacar o comprimento de onda utilizado no método (356 nm).

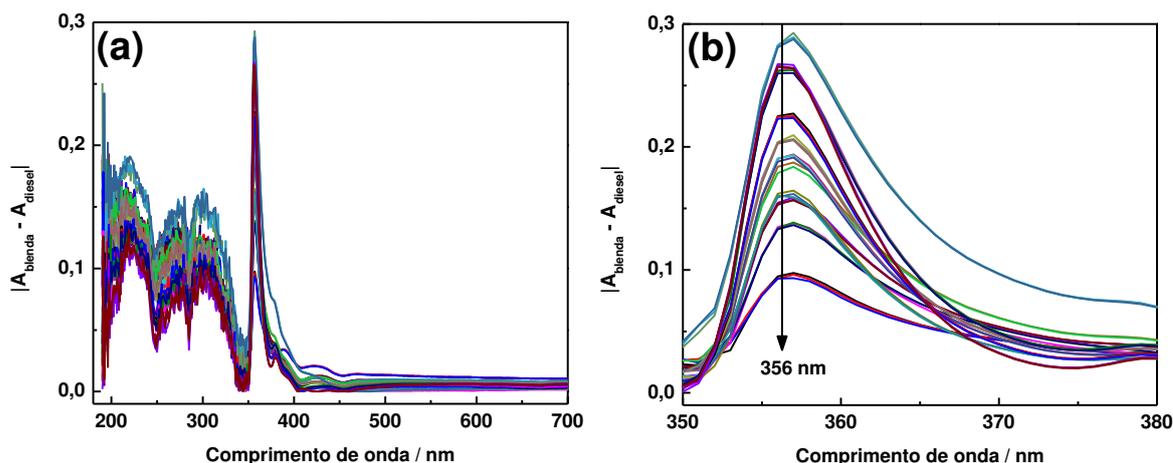


Figura 17. Gráfico de $|A_{\text{blenda}} - A_{\text{diesel}}|$ em função do comprimento de onda e (b) uma expansão de 350 a 380 nm para destacar o comprimento de onda utilizado na quantificação de biodiesel em blendas diesel-biodiesel.

A técnica UV-Vis fornece informações sobre as propriedades eletrônicas das moléculas. Todos os compostos orgânicos absorvem luz na região do UV e alguns também absorvem a luz na região do visível (LAMBERT *et al.*, 1998). Considerando-se as amostras utilizadas neste estudo, foi observado que a maior diferença entre os espectros do diesel e da blenda ocorre em 356 nm (Figura 17).

Assim, uma curva analítica foi construída a partir dessa informação espectral e das concentrações de biodiesel adicionada a cada blenda diesel-biodiesel. Os dados foram descritos por uma linha reta, usando análise de regressão linear (Figura 18).

Na Figura 18, pode ser observada correlação apropriada entre os dados de absorbância em 356 nm e a concentração de biodiesel nas blendas.

Amostras externas de blendas contendo 6,0%, 8,0%, e 10,0% v/v de biodiesel foram utilizadas para avaliar a capacidade de previsão da curva analítica construída. A Tabela 13 mostra as concentrações de biodiesel obtidas pelo método proposto UV-Vis e pelo método BS EN 14078.

Nela nota-se que há uma tendência dos resultados obtidos por UV-Vis serem ligeiramente inferiores aos resultados obtidos por IV (BS EN 14078). Então, os resultados de ambos os métodos foram comparados estatisticamente usando o

teste **t** de Student e o teste **F** para verificar a equivalência estatística dos resultados e da precisão dos métodos. Os resultados estatísticos também estão na Tabela 13.

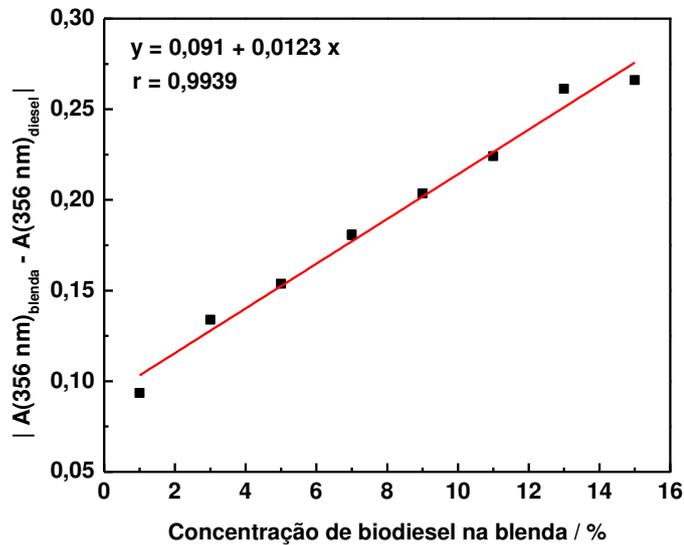


Figura 18. Curva analítica para a quantificação de biodiesel em blendas diesel-biodiesel pela absorbância em 356 nm.

Os valores de **t** apresentados na Tabela 13 indicam que, ao nível de confiança de 95%, todos os resultados obtidos com o método proposto UV-Vis foram estatisticamente equivalentes aos resultados obtidos com o método padrão BS EN 14078. No que diz respeito à precisão, os resultados do teste **F** mostram precisão equivalente quando o método UV-Vis foi comparado com o método BS EN 14078 ($\alpha = 0,05$).

Tabela 13. Resultados da concentração de biodiesel para as amostras externas pelo método BS EN 14078 e pelo método UV-Vis proposto, além dos resultados dos testes **F** e **t** de Student.

Amostras Externas	Concentração de biodiesel / % v/v		F	t
	BS EN 14078	Método UV-Vis		
B6 (6,0 ± 0,5)	6,0 ± 0,4	5,7 ± 0,1	16,00	1,03
B8 (8,0 ± 0,5)	8,3 ± 0,2	8,0 ± 0,1	4,00	1,90
B10 (10,0 ± 0,5)	10,0 ± 0,4	9,5 ± 0,1	16,00	1,71
Valor Crítico ($n_1 = n_2 = 3, v = 4, \alpha = 0,05$)			19,00	2,78

A Tabela 14 mostra algumas figuras de mérito para o método UV-Vis proposto. Foram obtidos valores excelentes em termos de precisão (pelos valores de DPR), bem como linearidade adequada ($r > 0,99$) para a curva analítica.

Para estimar o LD e o LQ, os parâmetros da referida curva analítica (Figura 18) foram empregados. Nesse caso, o LD e o LQ são estimados de acordo com as Equações 8 e 9.

$$LD = 3,3 \times \frac{s_a}{b} \quad (\text{Equação 8})$$

$$LQ = 10 \times \frac{s_a}{b} \quad (\text{Equação 9})$$

Em que: LD = Limite de detecção;

LQ = Limite de quantificação;

s_a = Estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica;

b = Coeficiente angular da curva analítica.

Tabela 14. Figuras de mérito do método univariado UV-Vis para quantificar biodiesel em blendas.

Amostra	DPR / %	r	Sensibilidade / (% v/v) ⁻¹	LD / % v/v	LQ / % v/v
B6	1,8				
B8	1,3	0,9939	0,0123 ± 0,0006	0,3	0,8
B10	1,1				

Fernandes e colaboradores (2011) reportaram um estudo para quantificar biodiesel em blendas pela técnica de UV-Vis; no entanto, eles utilizaram quimiometria e seleção de variáveis. Portanto, o método descrito aqui mostra vantagens, porque é o único método de UV-Vis univariado que quantifica o teor de biodiesel de forma direta em blendas padrão.

4.3.2. Método Multivariado por Modelo UV-Vis–PLS

Uma vez que o método proposto gerou resultados adequados para amostras externas, foram preparadas blendas B10 com a adição de óleo vegetal para avaliar o desempenho referente à substituição do biodiesel por óleo vegetal. Os resultados do teor de biodiesel para as amostras adicionadas de óleo vegetal, obtidos pelo método IV e pelo método UV-Vis, estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Concentração de biodiesel para as blendas B10 adicionadas de óleo vegetal, obtidas pelos métodos BS EN 14078 e UV-Vis (n=3).

Blendas B10 com adição de óleo vegetal		Concentração de biodiesel resultante a partir dos métodos	
Concentração de Biodiesel / % v/v	Concentração de Óleo Vegetal / % v/v	BS EN 14078 / % v/v	UV-Vis / % v/v
10,0	0	10,0 ± 0,4	9,5 ± 0,1
9,0	1,0	9,9 ± 0,8	9,4 ± 0,2
8,0	2,0	9,6 ± 0,6	9,6 ± 0,2
7,0	3,0	8,5 ± 0,5	9,4 ± 0,1
6,0	4,0	9,3 ± 0,9	10,3 ± 0,2
5,0	5,0	9,0 ± 0,7	9,4 ± 0,1
4,0	6,0	9,4 ± 0,2	10,2 ± 0,1
3,0	7,0	9,1 ± 0,3	9,7 ± 0,1
2,0	8,0	8,9 ± 0,7	10,1 ± 0,1
1,0	9,0	8,7 ± 0,5	10,3 ± 0,1
0	10,0	8,5 ± 0,6	10,2 ± 0,1

Os resultados na Tabela 15 mostram que nenhum dos métodos conseguiu identificar a diferença entre o biodiesel e óleo vegetal. Assim, conclui-se que apesar de ambos os métodos serem seletivos para a determinação de ésteres (biodiesel ou óleo vegetal), eles não são capazes de discriminar entre eles.

O método BS EN 14078 (2014a) baseia-se na absorbância medida em aproximadamente 1745 cm^{-1} , relacionada com o pico de absorção da carbonila de ésteres e as amostras de óleos vegetais e de biodieseis apresentam este pico em seus espectros de IV, como exemplificado na Figura 6. O método UV-Vis aqui

proposto baseia-se na absorvância medida em 356 nm, e o biodiesel e óleo vegetal apresentaram o mesmo perfil neste comprimento de onda.

Neste contexto, foi sugerido um modelo multivariado para verificar quantitativamente a presença de biodiesel em amostras de blendas adicionadas de óleo vegetal, o que simula uma possível adulteração. Foi construído um modelo PLS utilizando as amostras B10 da Tabela 15. Para calibrar, foram empregados 27 espectros e outros 6 foram utilizados como amostras externas. A faixa espectral de 350 a 700 nm foi considerada para executar a calibração por PLS. A Figura 19 mostra o gráfico de valores de referência \times valores previstos por calibração e por validação cruzada.

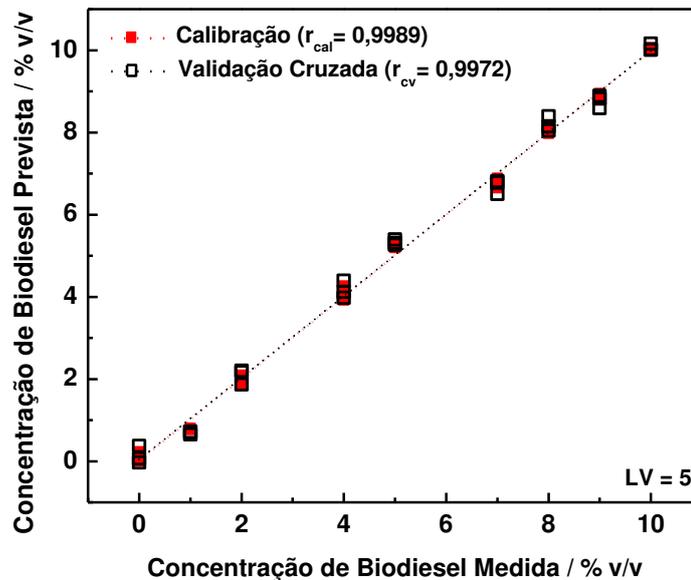


Figura 19. Valores de referência \times valores previstos pelo modelo UV-Vis-PLS para o teor de biodiesel em blendas diesel-biodiesel B10 adicionadas de óleo vegetal.

A partir da Figura 19, notam-se calibração e validação cruzada apropriadas, com valores de r_{cal} e r_{cv} (superiores a 0,99) que indicam correlações acentuadas entre os espectros UV-Vis e o teor de biodiesel na blenda diesel-biodiesel, mesmo na presença de óleo vegetal como adulterante.

Amostras externas de blendas contendo 3,0% e 6,0% v/v de biodiesel, com 7,0% e 4,0% v/v de óleo vegetal, respectivamente, foram utilizadas para avaliar a capacidade de previsão do modelo UV-Vis-PLS. A Tabela 16 mostra os teores de

biodiesel, obtidos pelo modelo proposto e pelos métodos univariados UV-Vis e BS EN 14078.

Tabela 16. Concentrações de biodiesel previstas pelos métodos univariados UV-Vis e BS EN 14078 e pelo modelo UV-Vis–PLS para as amostras externas de blendas adicionadas de óleo vegetal, além das concentrações de referência (n=3).

Amostras Externas de Blendas B10 com Adição de Óleo Vegetal				
Concentração de Biodiesel Resultante do Método BS EN 14078	Concentração de Biodiesel Resultante do Método UV-Vis	Concentração de Óleo Vegetal	Concentração de Biodiesel	Concentração de Biodiesel Previstas pelo Modelo UV-Vis–PLS
/ % v/v	/ % v/v	/ % v/v	/ % v/v	/ % v/v
9,1 ± 0,3	9,7 ± 0,1	7,0	3,0	2,5 ± 0,2
9,3 ± 0,9	10,3 ± 0,2	4,0	6,0	6,1 ± 0,2

A Tabela 16 mostra que, enquanto os métodos univariados BS EN 14078 e UV-Vis proporcionaram concentrações de biodiesel aproximadas de 10% v/v para as amostras que simulam adulterações, o modelo UV-Vis–PLS pôde reconhecer a diferença entre o biodiesel e óleo vegetal, produzindo resultados adequados, estatisticamente iguais aos valores de referência ($\alpha = 0,05$).

O modelo UV-Vis–PLS pôde distinguir o biodiesel do óleo vegetal porque o modelo considera um intervalo espectral de 350 a 700 nm, ao invés de apenas uma variável. Isto significa que pequenas diferenças entre os dados de UV-Vis do biodiesel e do óleo vegetal, que não são visualmente observadas, podem ser diferenciadas pelo modelo PLS.

A precisão do modelo multivariado foi expressa pelos erros RMSEC, RMSECV, RMSEP (BEEBE *et al.*, 1998), apresentados na Tabela 17, onde os coeficientes de correlação de calibração (r_{cal}), de validação (r_{cv}), e da previsão (r_{pre}), o número de LV, e o intervalo espectral (variáveis) estão igualmente apresentados.

A escolha do número de LV foi baseada nos valores de RMSECV. O cálculo desse parâmetro foi realizado para modelos que utilizam desde 1 até 15 LV, e os resultados de RMSECV em função do número de LV estão apresentados na Figura 20.

Tabela 17. Parâmetros do modelo PLS para determinar o teor de biodiesel em blendas.

Variáveis	Variáveis Latentes	RMSEC / % v/v	r_{cal}	RMSECV / % v/v	r_{cv}	RMSEP / % v/v	r_{pre}
350 – 700 nm	5	0,2	0,9989	0,3	0,9972	0,4	0,9975

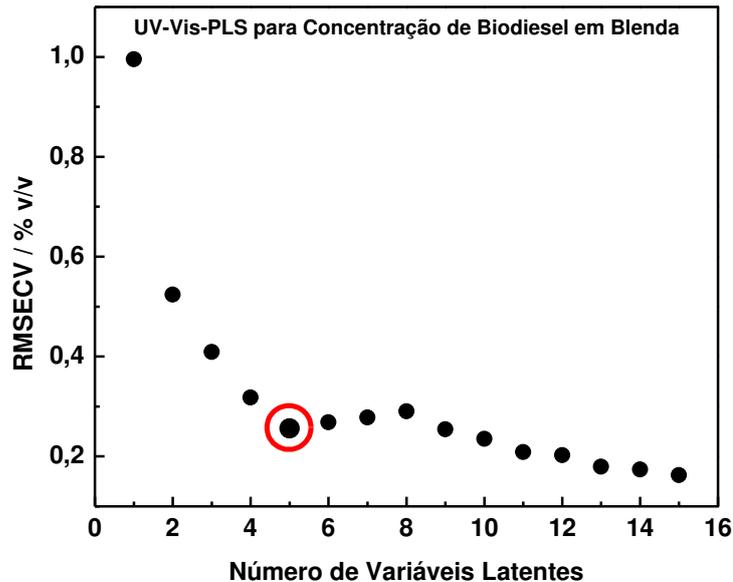


Figura 20. Valores de RMSECV em função do número de variáveis latentes para o modelo UV-Vis–PLS, que quantifica o teor de biodiesel em blendas diesel-biodiesel B10 adicionadas de óleo vegetal.

Nota-se na Figura 20 que para a determinação do teor de biodiesel em blendas diesel-biodiesel B10 adicionadas de óleo vegetal, optou-se por 5 LV para o modelo UV-Vis–PLS. Isso porque, a partir deste valor, não há diminuição significativa do valor de RMSECV, por mais que se aumente o número de LV.

Os parâmetros na Tabela 17 confirmam a adequação da calibração, da validação interna e do poder preditivo do modelo quimiométrico sugerido. A partir destes resultados, é proposta a aplicação do modelo PLS aqui apresentado para a determinação do teor de biodiesel, quando as amostras são suspeitas de adulteração com óleo vegetal.

O procedimento completo que é aqui proposto para verificar a qualidade da blenda diesel-biodiesel é composto por dois passos. O primeiro estima a

quantificação do biodiesel em blendas utilizando uma calibração univariada de dados em 356 nm (UV-Vis). Uma vez que o teor de biodiesel é estimado, é possível verificar se o resultado obtido de concentração é exclusivamente de biodiesel ou de misturas com óleo vegetal. A fim de fazer isso, um modelo UV-Vis–PLS pode ser construído fixando-se a proporção de diesel e variando a outra proporção com biodiesel e óleo vegetal. Para verificar se a amostra está adulterada com óleo vegetal ou não, os mesmos dados de UV-Vis são usados, no entanto, em vez de utilizar apenas o comprimento de onda em 356 nm, é empregado o intervalo de 350 a 700 nm. Nos casos em que se obtêm concentrações de biodiesel muito diferentes nos passos um e dois, esta amostra pode ter sido adulterada com óleo vegetal. Por exemplo, no primeiro passo 10% v/v de biodiesel (B10) é obtido, mas pelo segundo, este é de 7% v/v. Isso pode significar que esta blenda pode conter 90% v/v de diesel, 7% v/v de biodiesel, e 3% v/v de óleo vegetal.

Fernandes e colaboradores (2014) reportaram um estudo para detectar a adulteração de blendas diesel-biodiesel com óleo vegetal pela técnica de UV-Vis e um modelo qualitativo, ou seja, modelos que podem classificar as blendas como padrão ou adulterada. No entanto, os resultados aqui apresentados demonstram que a partir de dados de UV-Vis, também é possível construir modelos multivariados quantitativos para determinar a quantidade de biodiesel e óleo vegetal em amostras adulteradas, além da quantificação direta do teor de biodiesel em blendas padrão (sem o uso de ferramentas quimiométricas, analogamente ao método BS EN 14078).

O método univariado e o modelo PLS construído com a técnica UV-Vis para a quantificação de biodiesel em blendas diesel-biodiesel foram publicados no artigo intitulado “*Alternative methods to quantify biodiesel in standard diesel-biodiesel blends and samples adulterated with vegetable oil through UV–Visible spectroscopy*”, no periódico **Fuel**, v. 186, p. 199-203, 2016 (SHIMAMOTO & TUBINO, 2016).

4.3.3. Método Univariado por RMN ¹H

A Figura 21(a) mostra um espectro de RMN ¹H da blenda diesel-biodiesel B7, como um exemplo, e a Figura 21(b) mostra duas expansões para destacar os sinais utilizados no método para quantificar biodiesel em blendas por espectroscopia de RMN ¹H.

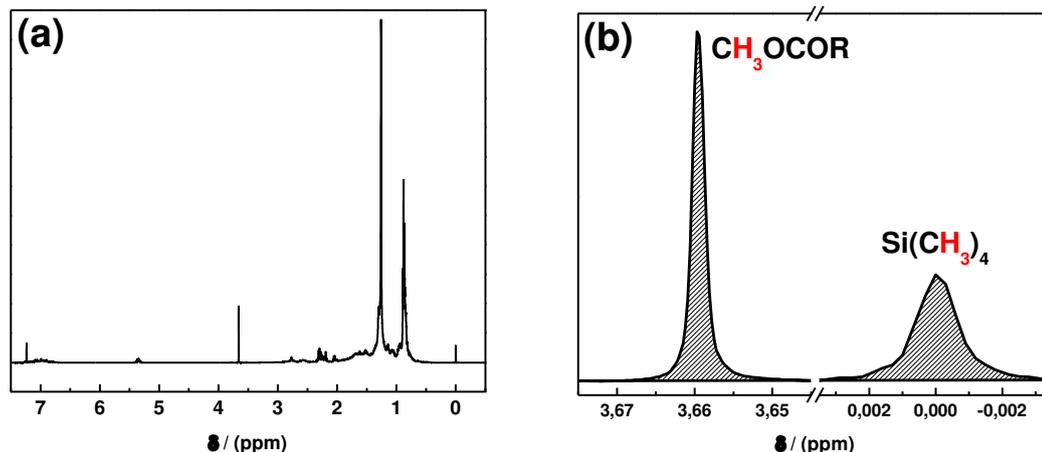


Figura 21. (a) Espectro de RMN ^1H da blenda diesel-biodiesel B7 e (b) duas expansões para destacar os sinais utilizados no método por RMN ^1H para quantificar biodiesel em blendas diesel-biodiesel.

Foram obtidas as integrais dos dois sinais apresentados na Figura 21(b): o sinal do OCH_3 do biodiesel (3,66 ppm) e o sinal do CH_3 do TMS de referência (0,00 ppm) que não se alterou com as adições de biodiesel em diesel. A integral do sinal em 0,00 ppm foi normalizada para 1,00, obtendo-se uma integral relativa do sinal do OCH_3 do biodiesel.

Uma curva analítica foi construída a partir da integral relativa do sinal do OCH_3 do biodiesel e das concentrações de biodiesel adicionado a cada uma das blendas. Os dados foram descritos por uma linha reta, utilizando-se regressão linear (Figura 22).

Na Figura 22, pode ser observada calibração apropriada, o que indica acentuada correlação entre os dados em 3,66 ppm e a concentração de biodiesel nas blendas.

Amostras externas de blendas contendo 6,0%, 8,0%, e 10,0% v/v de biodiesel foram utilizadas para avaliar a capacidade de previsão da curva analítica construída. A Tabela 18 mostra as concentrações de biodiesel obtidas pelo método proposto por RMN ^1H e pelo método descrito na norma BS EN 14078. Os resultados de ambos os métodos foram comparados estatisticamente com teste **t** de Student e com teste **F**. Os resultados estatísticos também são apresentados na Tabela 18.

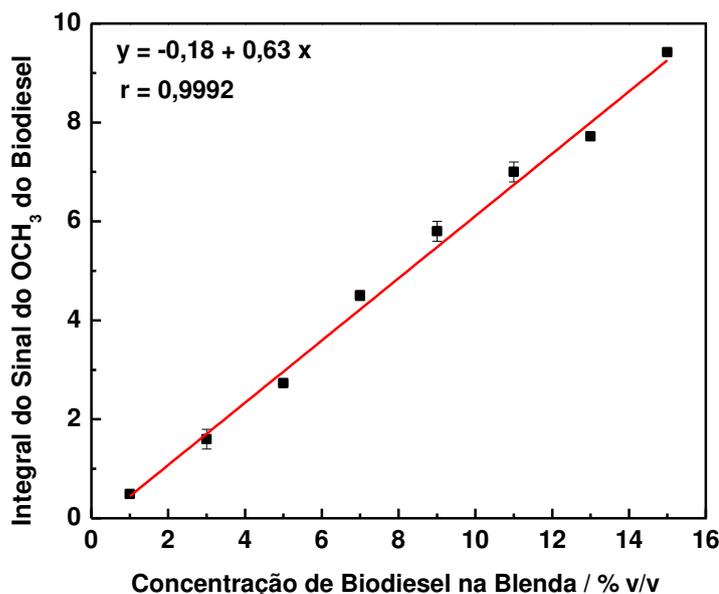


Figura 22. Curva analítica para a quantificação da concentração de biodiesel em blendas diesel-biodiesel, a partir da integral relativa do sinal do OCH₃ do biodiesel no espectro RMN ¹H.

Tabela 18. Resultados da concentração de biodiesel para as amostras externas pelo método EN 14078 e pelo método RMN ¹H proposto, além dos resultados dos testes **F** e **t** de Student.

Amostras Externas	Concentração de biodiesel / % v/v		F	t
	BS EN 14078	Método RMN ¹ H		
B6 (6,0 ± 0,5)	6,0 ± 0,4	6,4 ± 0,2	4,00	1,26
B8 (8,0 ± 0,5)	8,3 ± 0,2	8,1 ± 0,2	1,00	1,00
B10 (10,0 ± 0,5)	10,0 ± 0,4	9,9 ± 0,3	1,78	0,28
Valor Crítico (n ₁ = n ₂ = 3, v = 4, α = 0,05)			19,00	2,78

Os valores de **t** apresentados na Tabela 18 indicam que, ao nível de confiança de 95%, todos os resultados obtidos com o método proposto com RMN ¹H foram estatisticamente equivalentes aos resultados obtidos com o método padrão. No que diz respeito à precisão, os resultados mostram, a partir do teste **F**, precisão equivalente quando o método de RMN ¹H foi comparado com o método de BS EN 14078, ao nível de confiança de 95%.

Uma vez que resultados adequados foram obtidos pelo método proposto, blendas B10 foram preparadas com a adição de óleo vegetal para avaliar o

desempenho no que se refere à substituição do biodiesel por óleo vegetal. Os resultados do teor de biodiesel para as amostras adicionadas de óleo vegetal pelo método BS EN 14078 e pelo método RMN ¹H estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Concentração de biodiesel para as blendas B10 adicionadas de óleo vegetal, obtidas pelos métodos BS EN 14078 e RMN ¹H (n=3).

Blendas B10 com adição de óleo vegetal		Concentração de biodiesel resultante a partir dos métodos	
Concentração de Biodiesel / % v/v	Concentração de Óleo Vegetal / % v/v	BS EN 14078 / % v/v	RMN ¹ H / % v/v
10,0	0	10,0 ± 0,4	9,9 ± 0,3
9,0	1,0	9,9 ± 0,8	9,0 ± 0,7
8,0	2,0	9,6 ± 0,6	8,1 ± 0,1
7,0	3,0	8,5 ± 0,5	6,9 ± 0,1
6,0	4,0	9,3 ± 0,9	6,1 ± 0,3
5,0	5,0	9,0 ± 0,7	4,9 ± 0,3
4,0	6,0	9,4 ± 0,2	4,32 ± 0,06
3,0	7,0	9,1 ± 0,3	3,12 ± 0,05
2,0	8,0	8,9 ± 0,7	2,21 ± 0,04
1,0	9,0	8,7 ± 0,5	0,981 ± 0,006
0	10,0	8,5 ± 0,6	0,050 ± 0,007

Os resultados na Tabela 19 mostram que enquanto que o método por IV (BS EN 14078) não foi capaz de determinar a diferença entre o biodiesel e óleo vegetal, o método proposto utilizando RMN ¹H não encontra este problema, porque o sinal utilizado no método de RMN ¹H (3,66 ppm) é exclusivo de ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel). Por consequência, é possível quantificar o biodiesel normalmente e corretamente mesmo na presença de óleo vegetal.

Na Figura 23(a) são apresentados os espectros RMN ¹H de óleo de soja, de biodiesel e de diesel mineral. A Figura 23(b) mostra uma expansão da Figura 23(a) entre 4,10 e 4,35 ppm para destacar os sinais pertencentes aos triacilgliceróis (óleo vegetal) que podem ser utilizados no método de RMN ¹H para quantificar o óleo vegetal em blendas diesel-biodiesel.

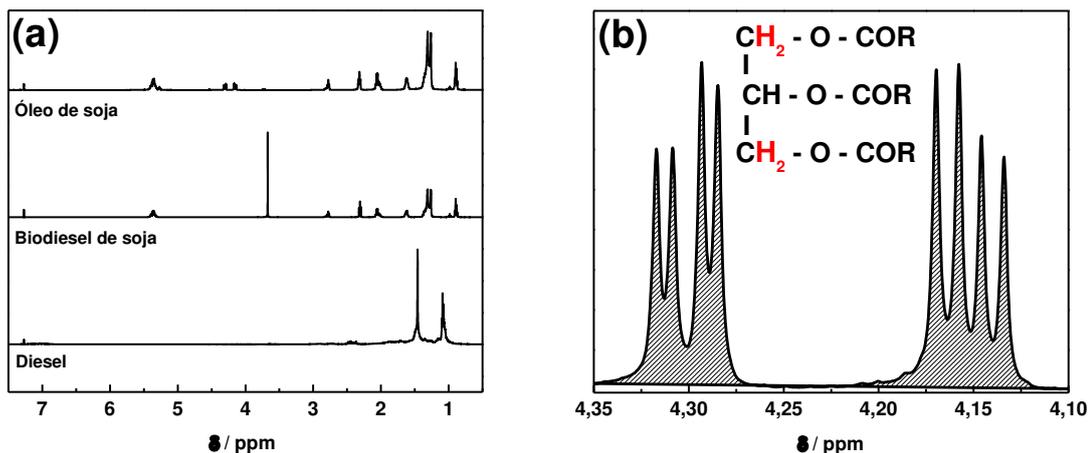


Figura 23. Espectros de RMN ¹H do óleo de soja, do biodiesel de soja e do diesel S10 (b) uma expansão do espectro entre 4,10 e 4,35 ppm para destacar os sinais utilizados no método que permite quantificar óleo vegetal por RMN ¹H, em blendas diesel-biodiesel.

Para calibrar o teor de óleo vegetal nas blendas adulteradas com esta matéria prima, foi obtida a integral relativa dos dois sinais dos CH₂ da estrutura do glicerol dos triacilgliceróis (4,15 e 4,30 ppm) (Figura 23(b)).

Uma curva analítica foi construída a partir da integral dos sinais dos triacilgliceróis e das concentrações de óleo vegetal adicionado para cada uma das blendas diesel-biodiesel. Os dados foram descritos por uma linha reta, a partir de regressão linear (Figura 24).

Na Figura 24, nota-se excelente correlação entre os dados em 4,30 e 4,15 ppm e a concentração de óleo vegetal nas blendas.

Amostras externas de blendas contendo, respectivamente, 8,0%, 5,0%, e 2,0% v/v de biodiesel e 2,0%, 5,0%, e 8,0% v/v de óleo vegetal foram utilizadas para avaliar a capacidade de previsão da curva analítica obtida. A Tabela 20 mostra os teores de óleo vegetal e de biodiesel obtidos pelos métodos propostos por RMN ¹H e seus respectivos valores de referência.

Os resultados na Tabela 20 demonstram que, além da técnica de RMN ¹H quantificar o biodiesel corretamente, mesmo na presença de óleo vegetal, ela ainda pode proporcionar a detecção e a quantificação de óleo vegetal, que esteja presente no biodiesel, seja como uma adição intencional e ilegal desta matéria prima ou por baixo grau de conversão da reação transesterificação, no processo de síntese de

biodiesel. Além disso, as quantificações de biodiesel e de óleo vegetal pelos métodos com RMN ^1H não exigem ferramentas quimiométricas ou cálculos e/ou equações complicadas.

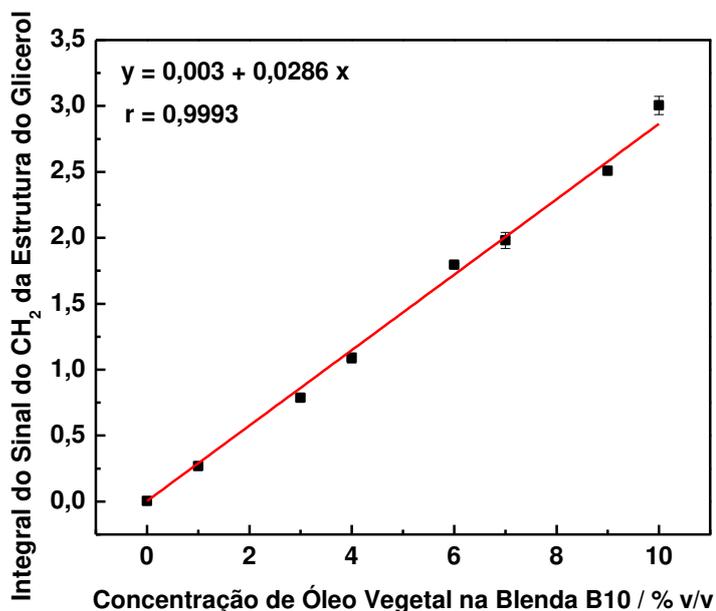


Figura 24. Curva analítica para a quantificação da concentração de óleo vegetal em blends diesel-biodiesel, a partir da integral do sinal do CH₂ da estrutura do glicerol dos triacilgliceróis no espectro RMN ^1H .

Tabela 20. Concentrações de biodiesel e de óleo vegetal a partir dos métodos RMN ^1H para as amostras de blends B10 adulteradas e seus respectivos valores de referência (n=3).

Concentração de Biodiesel / % v/v		Concentração de Óleo Vegetal / v/v	
Valor de Referência	Método RMN ^1H (Figura 22)	Valor de Referência	Método RMN ^1H (Figura 24)
8,0	8,1 ± 0,1	2,0	1,81 ± 0,04
5,0	4,9 ± 0,3	5,0	4,6 ± 0,1
2,0	2,21 ± 0,04	8,0	8,0 ± 0,2

Somente as integrais (áreas sob os picos) dos sinais de biodiesel, dos triacilgliceróis e de uma referência, neste caso, do TMS, são necessárias para quantificar o biodiesel e óleo vegetal em misturas diesel-biodiesel, utilizando apenas um espectro de RMN ^1H .

A Tabela 21 apresenta algumas figuras de mérito para os métodos propostos com RMN ^1H . Valores excelentes foram obtidos em termos de precisão (pelo DPR), bem como linearidade adequada ($r > 0,99$) das curvas analíticas a partir da técnica de RMN ^1H .

Tabela 21. Figuras de mérito dos métodos RMN ^1H .

Quantificação de	Métodos RMN ^1H				
	DPR / %	r	Sensibilidade / (% v/v) $^{-1}$	LD / % (v/v)	LQ / % (v/v)
Biodiesel	B6	3,1			
	B8	2,5	0,9992	$0,63 \pm 0,01$	0,006
	B10	3,0			0,02
Óleo Vegetal	B8OV2	2,2			
	B5OV5	2,2	0,9993	$0,0286 \pm 0,0004$	0,003
	B2OV8	2,5			0,01

Para estimar o LD e o LQ (Tabela 21) para os métodos por RMN ^1H , um branco foi simulado pela integração das regiões sem sinais e calculou-se o teor de biodiesel ou de óleo vegetal a partir destes dados. Portanto, o LD e o LQ foram estimados a partir do valor do branco somado a sua estimativa do desvio padrão multiplicada por 3 e por 10, respectivamente, como descrito anteriormente nas Equações 6 e 7 (MILLER & MILLER, 1993).

Em relação ao LD e ao LQ, os métodos com RMN ^1H apresentaram valores favoráveis considerando que o combustível diesel é atualmente (2017) comercializado no Brasil como uma mistura de diesel mineral com 8% v/v de biodiesel (B8) e que adulterações com óleos vegetais podem ser quantificadas a partir de 0,01% v/v de óleo vegetal nas blendas.

Os métodos univariados por RMN ^1H para a quantificação de biodiesel e óleo vegetal em blendas diesel-biodiesel foram publicados no artigo intitulado “*Alternative method to quantify biodiesel and vegetable oil in diesel-biodiesel blends through ^1H NMR spectroscopy*”, no periódico **Talanta**, v. 168, p. 121-125, 2017 (SHIMAMOTO & TUBINO, 2017).

CAPÍTULO 5:
CONCLUSÃO

Os espectros de RMN ^1H e de absorção no IV médio revelaram correlações com os seguintes parâmetros de óleo vegetal e de biodiesel: massa específica, viscosidade cinemática, índice de iodo, índice de acidez, período de indução e teor de água. A necessidade da utilização de calibração multivariada, pelo método PLS, indicou a complexidade das amostras e a influência de diversos fatores nos parâmetros avaliados. A construção desses modelos apresenta diversas vantagens, principalmente pela diminuição do número de análises a serem realizadas para caracterizar óleos vegetais e biodieseis.

Os espectros de RMN ^1H , de IV médio e o índice de iodo revelaram também adequação para o acompanhamento das reações de degradação de óleo vegetal e de biodiesel. Assim, ambas as técnicas instrumentais e o método clássico de Wijs podem ser utilizados em estudos para testar novos antioxidantes, para avaliar a eficiência destes em retardar os processos de degradação.

Em relação aos métodos desenvolvidos para quantificar metanol em biodiesel, os resultados demonstram desempenho adequado da técnica de RMN ^1H para a quantificação de metanol residual no biodiesel, seja pelo método da adição de padrão ou pelo método do padrão interno. Os métodos propostos apresentaram precisão e exatidão equivalentes aos resultados do método de cromatografia em fase gasosa (BS EN 14110). Assim, os dois métodos desenvolvidos podem ser sugeridos como alternativas para quantificar metanol residual em biodiesel.

No que se refere aos métodos que são propostos para quantificar biodiesel em blendas, os resultados demonstraram desempenho adequado da técnica de UV-Vis para a quantificação de biodiesel em blendas diesel-biodiesel padrão. Os resultados obtidos com o método proposto apresentaram precisão e exatidão semelhantes àqueles do método IV (BS EN 14078). Entretanto, nestes dois métodos os óleos vegetais podem atuar como interferentes na análise. Para solucionar isto, a aliança entre a técnica UV-Vis e a ferramenta PLS foi proposta para a análise quantitativa de biodiesel em amostras suspeitas de terem sido adulteradas com óleo vegetal. Já os resultados por RMN ^1H demonstraram

desempenho ainda melhor para a quantificação de biodiesel e óleo vegetal em blendas de diesel-biodiesel. O método proposto por RMN ^1H também apresentou precisão e exatidão semelhantes aos resultados do método IV (BS EN 14078) e, além disso, foi capaz de reconhecer a diferença entre o biodiesel e óleo vegetal. Assim, propõe-se o método UV-Vis como um método equivalente ao método oficial (com as mesmas vantagens e desvantagens) e o método por RMN ^1H como uma alternativa mais eficiente para quantificar o biodiesel em blendas e verificar adulteração com óleo vegetal simultaneamente.

CAPÍTULO 6:
TRATAMENTO DE RESÍDUOS

Todos os resíduos gerados durante os trabalhos experimentais foram descartados e/ou tratados corretamente de acordo com as normas da Comissão de Segurança do IQ-UNICAMP.

As soluções aquosas ácidas ou básicas sem íons tóxicos foram descartadas na pia após neutralização.

Os compostos orgânicos foram separados entre “clorados” e “não clorados”, armazenados em frascos adequados e submetidos à Comissão de Segurança para enviá-los para incineração.

CAPÍTULO 7:
PERSPECTIVAS

A análise “*screening*” para a determinação dos parâmetros de qualidade e caracterização de óleo vegetal e de biodiesel gera perspectivas para a calibração de outras propriedades, tais como: ponto de fulgor, teor de éster, número cetano, ponto de entupimento de filtro a frio, dentre outros. Além disso, as técnicas espectroscópicas de IV e de RMN também revelaram perspectivas para serem utilizadas em estudos da estabilidade e em testes que avaliam a eficiência de antioxidantes para óleo ou biodiesel.

O método que quantifica metanol residual em biodiesel metílico revela uma potencial perspectiva para o desenvolvimento de um método análogo que quantifica etanol residual em biodiesel etílico. Assim como os métodos desenvolvidos para quantificar biodiesel metílico nas blendas diesel-biodiesel também revelam potencial para o desenvolvimento de métodos análogos que quantifiquem biodiesel etílico nas blendas.

Todos os métodos propostos apresentam perspectivas de serem apresentados em reuniões da ABNT, no Rio de Janeiro e em São Paulo, visando à proposição de novas normas ABNT NBR para a análise e caracterização de biodiesel.

CAPÍTULO 8:
REFERÊNCIAS

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS; **Resolução ANP Nº 45 de 25.8.2014 - DOU 26.8.2014**. Disponível em: <www.anp.gov.br>. Acesso em 15 de jun. 2017.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS; **Resolução ANP Nº 30 de 23.6.2016 - DOU 24.6.2016**. Disponível em: <www.anp.gov.br>. Acesso em 15 de jun. 2017.

AOCS Official Method Cd 3d-63; Acid value, **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**, Firestone D. (Ed), 5th ed. Champaign: AOCS, 1973.

ARAUJO, R. T. S.; SARAIVA, M. L. M. F. S.; LIMA, J. L. F. C.; KORN, M. G. A.; Flow methodology for methanol determination in biodiesel exploiting membrane-based extraction, **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 2, p. 177–183, 2008.

ARICETTI, J. A.; TUBINO, M.; A green and simple visual method for the determination of the acid-number of biodiesel, **Fuel**, v. 95, p. 659-661, 2012a.

ARICETTI, J. A.; TUBINO, M.; A visual titration method for the determination of the acid number of oils and fats: A green alternative, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 11, p. 2113-2115, 2012b.

ASTM D445-17a; **Standard test method for kinematic viscosity of transparent and opaque liquids (and calculation of dynamic viscosity)**, 2017.

ASTM D6304-07; **Standard test method for determination of water in petroleum products, lubricating oils, and additives by coulometric Karl Fischer titration**, 2007.

ASTM D6751-15a; **Standard specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels**, 2015.

ASTM D7371-14; **Standard test method for determination of biodiesel (fatty acid methyl esters) content in diesel fuel oil using mid infrared spectroscopy (FTIR-ATR-PLS method)**, 2014.

ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, A. S.; A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070–2093, 2012.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como fazer experimentos**, 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B.; **Chemometrics: A practical guide**, New York: John Wiley & Sons, 1998.

BOOG, J. H. F.; SILVEIRA, E. L. C.; CALAND, L. B.; TUBINO, M.; Determining the residual alcohol in biodiesel through its flash point, **Fuel**, v. 90, p. 905–907, 2011.

BORSATO, D.; MAIA, E. C. R.; DALL'ANTONIA L. H.; SILVA, C.; PEREIRA, J. L.; Cinética da oxidação de biodiesel de óleo de soja em mistura com TBHQ: Determinação do tempo de estocagem, **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 733-737, 2012.

- BRANDÃO, L. F. P.; BRAGA, J. W. B.; SUAREZ, P. A. Z.; Determination of vegetable oils and fats adulterants in diesel oil by high performance liquid chromatography and multivariate methods, **Journal of Chromatography A**, v. 1225, p. 150-157, 2012.
- BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G.; Quimiometria, **Química Nova**, v. 8, n. 2, p. 84-99, 1985.
- BS EN 14111:2003; **Fat and oil derivatives – fatty acid methyl esters (FAME) – determination of iodine value**, 2003a.
- BS EN 14112:2016; **Fat and oil derivatives. Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test)**, 2016.
- BS EN 14078:2014; **Liquid petroleum products – Determination of fatty acid methyl ester (FAME) content in middle distillates – Infrared spectrometry method**, 2014a.
- BS EN 14110:2003; **Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of methanol content**, 2003b.
- BS EN 14214:2012+A1:2014; **Liquid petroleum products – fatty acid methyl esters (FAME) for use in diesel engines and heating applications – Requirements and test methods**, 2014b.
- CANHA, N.; FELIZARDO, P.; MENEZES, J. C.; CORREIA, J. N.; Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting the oxidativestability of biodiesel: Effect of antioxidants addition, **Fuel**, v. 97, p. 352-357, 2012.

- CASTILHO-ALMEIDA, E. W.; DOS SANTOS, H. F.; DE MIRANDA, A. M.; JORIO, A.; FERREIRA, E. H. M.; ACHETE, C. A.; ARMOND, R. A. S. Z.; Estudo teórico e experimental de espectros infravermelho de ésteres de ácido graxo presentes na composição do biodiesel de soja, **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1752-1757, 2012.
- CHRISTENSEN, E.; MCCORMICK, R. L.; Long-term storage stability of biodiesel and biodiesel blends, **Fuel Processing Technology**, v. 128, p. 339-348, 2014.
- DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; Rampin, M. A.; Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria, **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.
- DE ANDRADE, D. F.; **Caracterização de biodiesel através da separação dos constituintes por cromatografia líquida**; 2011, 144 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- DE SOUZA, A. M.; BREITKREITZ, M. C.; FILGUEIRAS, P. R.; ROHWEDDER, J. J. R.; POPPI, R. J.; Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II, **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057-1065, 2013.
- FARMER, E. H.; BLOOMFIELD, G. G.; SUNDRALINGAM, S.; SUTTON, D. A.; The cause and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances, including rubber, **Transactions of the Faraday Society**, v. 38, p. 348-356, 1942.

- FELGNER, A.; SCHLINK, R.; KIRSCHENBÜHLER, P.; FAAS, B.; ISENGARD, H. D.; Automated Karl Fischer titration for liquid samples – Water determination in edible oils, **Food Chemistry**, v. 106, p. 1379-1384, 2008.
- FELIZARDO, P.; BAPTISTA, P.; MENEZES, J. C.; CORREIA, M. J. N.; Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting methanol and water content in biodiesel, **Analytica Chimica Acta**, v. 595, n. 1-2, p. 107-113, 2007a.
- FELIZARDO, P.; BAPTISTA, P.; UVA, M. S.; MENEZES, J. C.; CORREIA, M. J. N.; Monitoring biodiesel fuel quality by near infrared spectroscopy, **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 15, n. 2, p. 97-105, 2007b.
- FERNANDES, D. D. S.; GOMES, A. A.; COSTA, G. B.; SILVA, G. W. B.; VÉRAS, G.; Determination of biodiesel content in biodiesel/diesel blends using NIR and visible spectroscopy with variable selection, **Talanta**, v. 87, p. 30-34, 2011.
- FERNANDES, D. D. S.; GOMES, A. A.; FONTES, M. M.; COSTA, G. B.; ALMEIDA, V. E.; ARAÚJO, M. C. U.; GALVÃO, R. K. H.; VÉRAS, G.; UV-Vis spectrometric detection of biodiesel/diesel blend adulterations with soybean oil, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 1, p. 169-175, 2014.
- FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O.; Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial, **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.
- FERREIRA, M. M. C.; **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**, Campinas: Editora da Unicamp, 2015.

FRANKEL, E. N.; **Lipid oxidation**, 2nd ed. Bridgwater: Oily, 2005.

FRANKEL, E. N.; Recent advances in lipid oxidation, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 54, p. 495-511, 1991.

GALVAN, D.; ORIVES, J. R.; COPPO, R. L.; SILVA, E. T.; ANGILELLI, K. G.; BORSATO, D.; Determination of the kinetics and thermodynamics parameters of biodiesel oxidation reaction obtained from an optimized mixture of vegetable oil and animal fat, **Energy & Fuels**, v. 27, n. 11, p. 6866-6871, 2013.

GAYDOU, V.; KISTER, J.; DUPUY, N.; Evaluation of multiblock NIR/MIR PLS predictive models to detect adulteration of diesel/biodiesel blends by vegetal oil, **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 106, n. 2, p. 190-197, 2011.

GELADI, P.; KOWALSKI, B.; Partial least squares regression: A tutorial, **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.

HIATT, R.; MILL, T.; MAYO, F. R.; IRWIXAN, K. C.; CASTLEMAN, D. J. K.; GOULD, C. W.; Homolytic decompositions of hydroperoxides I – V, **The Journal of Organic Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 1416-1441, 1968.

JOSHI, G.; LAMBA, B. Y.; RAWAT, D. S.; MALLICK, S.; MURTHY, K. S. R.; Evaluation of additive effects on oxidation stability of Jatropha curcas biodiesel blends with conventional diesel sold at retail outlets, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 22, p. 7586-7592, 2013.

KNOTHE, G.; Some aspects of biodiesel oxidative stability, **Fuel Processing Technology**, v. 88, n. 7, p. 669-677, 2007.

KNOTHE, G.; STEIDLEY, K. R.; Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components, **Fuel**, v. 84, p. 1059-1065, 2005.

KNOTHE, G.; Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value?, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 9, p. 847-854, 2002.

LAMBERT, J. B.; SHURVELL, H. F.; LIGHTNER, D. A.; COOKS, R. G.; **Organic structural spectroscopy**, Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1998.

LEUNG, D. Y. C.; KOO, B. C. P.; GUO, Y.; Degradation of biodiesel under different storage conditions, **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 250-256, 2006.

LÔBO, I. P.; FERREIRA S. L. C.; CRUZ, R. S.; Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos, **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

MAHAMUNI, N. N.; ADEWUYI, Y. G.; Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) method to monitor soy biodiesel and soybean oil in transesterification reactions, petrodiesel-biodiesel blends, and blend adulteration with soy oil, **Energy & Fuels**, v. 23, n. 7, p. 3773-3782, 2009.

MARTINI D. S.; **Polímeros derivados do biodiesel do óleo de linhaça: obtenção e propriedades físico-químicas**; 2010, 93 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N.; **Statistics for analytical chemistry**, 3th ed. London: Ellis Horwood PTR Prentice Hall, 1993.

- MONTEIRO, M. R.; AMBROZIN, A. R. P.; LIÃO, L. M.; BOFFO, E. F.; PEREIRA-FILHO, E. R.; FERREIRA, A. G.; ^1H NMR and multivariate calibration for the prediction of biodiesel concentration in diesel blends, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, p. 581-585, 2009a.
- MONTEIRO, M. R.; AMBROZIN, A. R. P.; LIÃO, L. M.; FERREIRA, A. G.; Determination of biodiesel blend levels in different diesel samples by ^1H NMR, **Fuel**, v. 88, p. 691-696, 2009b.
- MONTEIRO, M. R.; AMBROZIN, A. R. P.; SANTOS, M. S.; BOFFO, E. F.; PEREIRA-FILHO, E. R.; LIÃO, L. M.; FERREIRA, A. G.; Evaluation of biodiesel-diesel blends quality using ^1H NMR and chemometrics, **Talanta**, v. 78, p. 660-664, 2009c.
- MUSHARRAF, S. G.; AHMED, M. A.; ZEHRAA, N.; Quantification of FAMES in biodiesel blends of various sources by gas chromatography tandem mass spectrometry, **Analytical Methods**, v. 7, p. 3372-3378, 2015.
- PAIVA, E. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; PASQUINI, C.; PIMENTEL, M. F.; PEREIRA, C. F.; Quantification of biodiesel and adulteration with vegetable oils in diesel/biodiesel blends using portable near-infrared spectrometer, **Fuel**, v. 160, p. 57-63, 2015.
- PARASCHIVESCU, M. C.; ALLEY, E. G.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; ARMBRUST, K.; Determination of methanol in biodiesel by headspace solid phase microextraction, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5901-5905, 2008.
- PIMENTEL, M. F.; RIBEIRO, G. M. G. S.; CRUZ, R. S.; STRAGEVITCH, L.; PACHECO-FILHO, J. G. A.; TEIXEIRA, L. S. G.; Determination of

biodiesel content when blended with mineral diesel fuel using infrared spectroscopy and multivariate calibration, **Microchemical Journal**, v. 82, p. 201-206, 2006.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B.; Biodiesel: an overview, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6b, p. 1313-1330, 2005.

PORTAL BRASIL; **Biodiesel**, Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br>>, Acesso em 15 de jun. 2017.

PULLEN, J.; SAEED, K.; An overview of biodiesel oxidation stability, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 5924-5950, 2012.

ROY, A. S.; CHINGKHEIHUNBA, A.; PAKSHIRAJAN, K.; **An overview of production, properties, and uses of biodiesel from vegetable oil**. In: SOCCOL C.; BRAR S.; FAULDS C.; RAMOS L.; Ed(s). Green Fuels Technology. Green Energy and Technology. Cham: Springer, 2016. p. 83-105.

RUSCHEL, C. F. C.; HUANG, C. T.; SAMIOS, D.; FERRÃO, M. F.; Análise exploratória aplicada a espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) de blendas de biodiesel/diesel, **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 810-815, 2014.

SANTOS, M. S.; COLNAGO, L. A.; Validação de método quantitativo por RMN de ^1H para análises de formulações farmacêuticas, **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 324-330, 2013.

- SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M.; Transesterification of vegetable oils: A review, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.
- SERRANO, M.; BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J.; Oxidation stability of biodiesel from different feedstocks: Influence of commercial additives and purification step, **Fuel**, v. 113, p. 50-58, 2013.
- SHARAF, M. A.; ILLMAN, D. L.; KOWALSKI, B. R.; **Chemometrics**, 1. ed. New York: John Wiley & Sons, 1986.
- SHIMAMOTO, G. G.; ARICETTI, J. A.; TUBINO, M.; A simple, fast, and green titrimetric method for the determination of the iodine value of vegetable oils without Wijs solution (ICl), **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 2479-2483, 2016.
- SHIMAMOTO, G. G.; BIANCHESSI, L. F.; TUBINO, M.; Alternative method to quantify biodiesel and vegetable oil in diesel-biodiesel blends through ^1H NMR spectroscopy, **Talanta**, v. 168, p. 121-125, 2017.
- SHIMAMOTO, G. G.; FAVARO, M. M. A.; TUBINO, M.; Simple methods via mid-IR or ^1H NMR spectroscopy for the determination of the iodine value of vegetable oils, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 7, p. 1431-1437, 2015.
- SHIMAMOTO, G. G.; TUBINO, M.; Alternative methods to quantify biodiesel in standard diesel-biodiesel blends and samples adulterated with vegetable oil through UV–Visible spectroscopy”, **Fuel**, v. 186, p. 199-203, 2016.

- SHIMAMOTO, G. G.; TUBINO, M.; Quantification of methanol in biodiesel through ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy, **Fuel**, v. 175, p. 99-104, 2016.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A.; Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante, **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.
- SILVA, W. L. G.; SOUZA, P. T.; SHIMAMOTO, G. G.; TUBINO, M.; Separation of the glycerol-biodiesel phases in an ethyl transesterification synthetic route using water, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1745-1750, 2015.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; **Spectrometric identification of organic compounds**, 7. ed. New York: John Wiley, 2005.
- SIMPSON, J. H.; **Organic structure determination using 2D NMR spectroscopy: a problem-based approach**, Amsterdam: Elsevier, 2008.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; **Principles of instrumental analysis**, 5 ed. Philadelphia: Saunders College, 1998.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; **Fundamentals of analytical chemistry**, 7th ed. Victoria: Brooks, 1996
- SOARES, I. P.; REZENDE, T. F.; PEREIRA, R. C. C.; SANTOS, C. G.; FORTES, I. C. P.; Determination of biodiesel adulteration with raw vegetable oil from ATR-FTIR data using chemometric tools, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 1229-1235, 2011.

- SOUZA, F. H. N.; MAIA, F. J. N.; MAZZETTO, S. E.; NASCIMENTO T. L.; ANDRADE, N. C.; OLIVEIRA, A. L. N. F.; RIOS, M. A. S.; Oxidative stability of soybean biodiesel in mixture with antioxidants by thermogravimetry and Rancimat method, **Chemical & Biochemical Engineering Quarterly**, v. 27, n. 3, 327-334, 2013.
- SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B.; Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los, **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.
- TESFA, B.; MISHRA, R.; GU, F.; POWLES, N.; Prediction models for density and viscosity of biodiesel and their effects on fuel supply system in CI engines, **Renewable Energy**, v. 35, n. 12, p. 2752-2760, 2010.
- YAAKOB, Z.; NARAYANAN, B.N.; PADIKKAPARAMBIL, S.; UNNI, K. S.; AKBAR, M.; A review on the oxidation stability of biodiesel, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 136-153, 2014.