



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Aplicação de Espectroscopia no Infravermelho Médio e Calibração
Multivariada para quantificação de adulterantes em biodieseis de óleo de soja
e residual e suas misturas com diesel**

Mestranda: Eloiza Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto

Uberlândia

Fevereiro 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Aplicação de Espectroscopia no Infravermelho Médio e Calibração
Multivariada para quantificação de adulterantes em biodieseis de óleo de soja
e residual e suas misturas com diesel**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Uberlândia,
como requisito para obtenção de título
de Mestre em Química.**

Mestranda: Eloiza Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto

Área de concentração: Química Analítica

Uberlândia

Fevereiro 2014



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em
Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 180/PPQUI.

DATA: 14/02/2014

DISCENTE: Eloiza Guimarães

MATRÍCULA: 11212QMI006

TÍTULO DO TRABALHO: Aplicação de espectroscopia no infravermelho médio e calibração multivariada para quantificação de adulterantes em biodieséis de óleo de soja e residual e suas misturas com diesel.

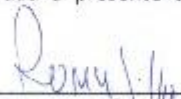
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

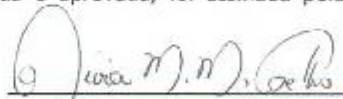
LINHA DE PESQUISA: Espectroanalítica Aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Aplicação de espectroscopia na região do infravermelho aliada ao método de calibração multivariada para controle de qualidade de biocombustíveis.

Às quatorze horas do dia quatorze de fevereiro do ano dois mil e quatorze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Ronei Jesus Poppi, da Universidade Estadual de Campinas, Nívia Maria Melo Coelho e Waldomiro Borges Neto, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 16 horas e 03 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi
UNICAMP


Profª Dra. Nívia Maria Melo Coelho
IQUFU


Orientador(a): Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto – IQUFU

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos que sofreram comigo nos momentos difíceis, compartilharam as alegrias, acreditaram no meu trabalho e contribuíram para a realização do mesmo.

"Bom mesmo, é ir à luta com muita alegria, determinação e perseverança, abraçando a vida, ajudando nosso semelhante e vivendo com paixão, sabendo perder com classe e vencer com ousadia, pois, o triunfo pertence a quem vai à luta, se atreve e não desiste de seus sonhos. A vida é algo muito importante para ser insignificante". Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** pelo dom da vida e por permitir pessoas maravilhosas em minha vida. "Bem como a prata se prova no fogo e o ouro no crisol, assim o Senhor prova os corações".

A minha **MÃE**, por confiar no meu talento, pelas noites de oração e, principalmente por ser "**A minha Mãe**".

Aos meus filhos: **Lara, Leonardo e Luís Gustavo** que sofreram comigo todos os momentos de angústia e acreditaram no trabalho. Amo vocês.

Aos meus familiares, amigos pela amizade, confiança, incentivo e orações.

A minha amada irmã **Elenice** (*in memoriam*) que com essa simples e sábia frase foi o combustível que moveu minha vida: "**Sê vai conseguir**".

Ao Prof. Dr. **Waldomiro Borges Neto**, pelos conhecimentos, amizade, confiança, paciência, preocupação, dedicação, braveza, etc. e, finalmente por acreditar no "refugio". Professor, as pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem. Sou eternamente grata por ter sido o Meu Orientador.

Ao Prof. Dr. **Douglas Queiroz Santos** pelos ensinamentos na produção de biodiesel e pela agradável presença em nossas reuniões festivas.

A todos os professores, vivos ou in memoriam que um dia fizeram parte da minha formação.

Aos meus colegas do LQT: **Lucas** (Maza), **Hery** (Pokemon), **Letícia** (Abobrón), **Felipe Bachion** (Chuck Norris), **Sarmento** (Caramunhão), **Carlos** (Carlão), **Fábio** (Temozim), **Edvando** (Baiano), **Zé Eduardo** (Buiatte), pelo incentivo, companheirismo, amizade, paciência, discussões, viagens... Foram muitos os momentos de tensões, alegrias, gargalhadas e festas.

A FAPEMIG pelo financiamento do projeto 17.014/11.

A TRANSPETRO pelo fornecimento do diesel.

Ao IQUFU por fornecer toda estrutura física e tecnológica para a realização deste trabalho.

A UFU pela oportunidade de aprimorar os meus conhecimentos.

"Eu sou parte de uma equipe. Então quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma, termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas". Ayrton Senna

RESUMO

APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ADULTERANTES EM BIODIESEIS DE ÓLEO DE SOJA E RESIDUAL E SUAS MISTURAS COM DIESEL.

Autora: Eloiza Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível (ANP) estabelece a obrigatoriedade na adição de 5% (v/v) de biodiesel ao diesel comercializado no país. Durante a produção pode ser gerado resíduo do álcool utilizado, produto este indesejável para a qualidade do biodiesel. Já na comercialização pode ocorrer adulteração pela adição de óleos vegetais. No presente trabalho foram desenvolvidas e validadas metodologias baseadas no uso da Espectroscopia no Infravermelho Médio (MIR) aliada à calibração multivariada por Quadrados Mínimos Parciais (PLS) para a quantificação de álcoois nos biodieseis metílicos e etílicos de óleo de soja e residual e, óleo refinado e residual em suas misturas binárias com diesel. Para os modelos de biodiesel/diesel (B5), os resultados foram satisfatórios com valores de RMSEP (Erro Quadrático Médio de Previsão), abaixo de 0,27% (m/m) e EM (média do erro relativo) abaixo de 1,84%. Além disso, apresentaram excelente correlação com coeficientes de correlação (R) acima de 0,9997 e a não existência de erros sistemáticos, conforme a norma ASTM E1655-05. Quanto ao inverso da sensibilidade foram encontrados valores de concentração abaixo de 0,09% (m/m). Quanto ao limite de detecção e quantificação, os modelos construídos só podem detectar valores iguais ou superiores a 0,26% (m/m) e quantificar acima de 0,79% (m/m). Para os modelos de biodiesel puro (B100), os resultados foram também satisfatórios com valores de RMSEP, abaixo de 0,02% (m/m) e EM abaixo de 3,00%. Apresentaram coeficientes de correlação (R) acima de 0,9961 e a não existência de erros sistemáticos, conforme critérios estabelecidos pela norma ASTM E1655-05. Quanto ao inverso da sensibilidade foram encontrados valores de concentração abaixo de 0,005% (m/m). Para os limites de detecção e quantificação, os modelos construídos só podem detectar valores iguais ou superiores a 0,03% (m/m) e quantificar acima de 0,09% (m/m). Portanto, as metodologias desenvolvidas podem ser uma alternativa promissora no controle de qualidade deste combustível quanto a possíveis adulterações.

Palavras-chave: Biodiesel; Quimiometria; PLS; Infravermelho.

ABSTRACT

APPLICATION OF MIDDLE INFRARED SPECTROSCOPY AND MULTIVARIATE CALIBRATION FOR QUANTIFICATION OF ADULTERANTS IN BIODIESELS SOYBEAN OIL AND RESIDUAL AND THEIR BLENDS WITH DIESEL.

Author: Eloiza Guimarães

Advisor: Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto

The National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP) establishes the obligation of adding 5% (v/v) of biodiesel to diesel sold in the commercialized country. During the production residue can be generated from the alcohol used, and this product is undesirable to the quality of biodiesel. During the commercialization an adulteration can occur by the addition of vegetable oils. In both cases it becomes crucial analytical control of this fuel.

In this work methodologies were developed and validated based on the use of Spectroscopy in Infrared Middle (MID) combined with multivariate calibration Partial Least Squares (PLS) for quantification of methyl and ethyl alcohols in biodiesels from soybean and residual oil and refined oil and residual in their binary mixtures with diesel. For models of biodiesel / diesel (B5) the results were satisfactory with RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction), below 0.27 % (w/w) and MS (mean of relative error) below 1.84 %. Additionally, it was shown an excellent correlation between the actual values and concentration predicted by PLS models, with correlation coefficient (R) above 0.9997 and the absence of systematic errors, based on criteria established ASTM E1655 - 05. As to the inverse of the sensitivity concentration values below 0.09% (w / w) were found. As to the limit of detection and quantification models constructed can only detect than or equal to 0.26% (m / m) and quantified values above 0.79% (w / w).

For models of pure biodiesel (B100) the results were also satisfactory with RMSEP below 0.02% (w / w) and below 3.00%. Showed correlation coefficients (R) above 0.9961 and the absence of systematic errors, based on criteria established by ASTM E1655-05. As to the inverse of the sensitivity concentration values below 0.005% (w / w) were found. To the limits of detection and quantification models constructed can only detect than or equal to 0.03% (w/ w) and quantified values above 0.09% (w / w).

Therefore, the methodologies developed can be a promising alternative for the quality control of this fuel against possible adulteration.

Keywords: Biodiesel; Chemometrics; PLS; Infrared.

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------|--|
| ABIOVE | Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais |
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| ANP | Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ASTM | American Society for Testing and Materials |
| ATR | Reflectância Total Atenuada (do inglês, Attenuated Total Reflectance) |
| B5 | 5% de biodiesel e 95% de diesel em volume |
| B100 | Biodiesel puro |
| BES | Biodiesel Etílico de Soja |
| BER | Biodiesel Etílico Residual |
| BMS | Biodiesel Metílico de Soja |
| BMR | Biodiesel Metílico Residual |
| CG | Cromatografia em Fase Gasosa |
| CV | Validação Cruzada (do inglês, Cross Validation) |
| EM | Média do Erro Relativo |
| EN | Norma Europeia |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, High Performance Liquid Chromatography) |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| KNN | Classificação do vizinho mais Próximo (do inglês, Nearest Neighbor Classification) |
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| MCR | Resolução de Curvas Multivariadas, (do inglês, Multivariate Curve Resolution) |
| MIR | Infravermelho Médio (do inglês, Middle Infrared) |
| MLR | Regressão Linear Múltipla (do inglês, Multiple Linear Regression) |
| NIR | Infravermelho Próximo (do inglês, Near Infrared) |
| NAS | Sinal Analítico Líquido (do inglês, Net Analyte Signal) |
| PC | Componente Principal (do inglês, Principal Component) |
| PCA | Análise de Componentes Principais (do inglês, Principal Components Analysis) |

| | |
|--------|--|
| PCR | Regressão por Componentes Principais (do inglês, Principal Components Regression) |
| PLS | Quadrados Mínimos Parciais (do inglês Partial Least Squares) |
| PNPB | Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel |
| R | Coefficiente de Correlação |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RMSEC | Erro Quadrático Médio da Calibração (do inglês, Root Mean Square Error of Calibration) |
| RMSECV | Erro Quadrático Médio da Validação Cruzada (do inglês, Root Mean Square Error of Cross Validation) |
| RMSEP | Erro Quadrático Médio da Previsão (do inglês, Root Mean Square Error of Prediction) |
| SDV | Desvio Padrão da Validação (do inglês, Standard Deviation of Validation) |
| VL | Variável Latente. |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1. | Regiões espectrais do infravermelho..... | 15 |
| Tabela 2. | Número de amostras no conjunto de calibração e previsão para os modelos B5..... | 45 |
| Tabela 3. | Valores de RMSECV, RMSEC, RMSEP e R para os modelos BES5 e BER5 com e sem amostras anômalas..... | 47 |
| Tabela 4. | Parâmetros de exatidão dos modelos B5 construídos..... | 48 |
| Tabela 5. | Resultados dos parâmetros de figuras de mérito para os modelos B5..... | 52 |
| Tabela 6. | Parâmetros dos modelos B100 construídos..... | 56 |
| Tabela 7. | Resultados de exatidão dos modelos B100 construídos..... | 57 |
| Tabela 8. | Resultados dos parâmetros de figuras de mérito para os modelos B100..... | 61 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1. | Oferta de Energia Interna no país..... | 08 |
| Figura 2. | Reação global de transesterificação..... | 10 |
| Figura 3. | Não conformidades de Diesel B..... | 13 |
| Figura 4. | Espectros dos biodieseis etílico e metílico de soja e residual, óleo de soja e diesel..... | 16 |
| Figura 5. | ATR horizontal e espectrofotômetro FTMIR, respectivamente..... | 17 |
| Figura 6. | Representação da construção da matriz X para calibração multivariada..... | 19 |
| Figura 7. | Decomposição da matriz X na matriz de escores (T), pesos (P) e resíduos (E). | 20 |
| Figura 8. | Representação de duas Componentes Principais..... | 21 |
| Figura 9. | Rotação no eixo do PC (Variável Latente)..... | 21 |
| Figura 10. | Representação geométrica da decomposição do sinal analítico..... | 25 |
| Figura 11. | Processo de Reação de Transesterificação..... | 35 |
| Figura 12. | Processo de retirada do excesso de álcool na produção de biodiesel etílico..... | 36 |
| Figura 13. | Separação das Fases: biodiesel e glicerol..... | 36 |
| Figura 14. | Processo de Purificação do Biodiesel..... | 37 |
| Figura 15. | Processo de Secagem do Biodiesel | 37 |
| Figura 16. | Espectros de misturas de biodiesel em diesel. a) BES 5, b) BMS5, c) BER5 e d) BMR5..... | 38 |
| Figura 17 | Espectros dos biodieseis puros. a) BES 100, b) BMS100, c) BER100 e d) BMR100. | 39 |
| Figura 18 | Gráfico de RMSECV para os modelos BES5 (a), BMS5(b), BER5(c) e | 44 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| | BMR5(d)..... | |
| Figura 19. | Detecção de amostras anômalas através do gráfico de leverage versus resíduos..... | 45 |
| Figura 20. | Ajuste para as amostras de B5 adulteradas com óleo: (a) BES5 (b) BMS5 (c) BER5 (d) BMR5..... | 46 |
| Figura 21. | Norma do NAS versus valores de referência das concentrações para as amostras de calibração e validação..... | 47 |
| Figura 22. | Gráfico de erros para as amostras B5 adulteradas com óleo..... | 48 |
| Figura 23. | Gráfico de intervalo de confiança para as amostras B5 adulteradas com óleo. BES5(a), BMS5(b), BER5(c) e BMR5(d). | 49 |
| Figura 24. | Gráfico de RMSECV para os modelos BES100 (a), BMS100 (b), BER100 (c) e BMR100 (d)..... | 50 |
| Figura 25. | Detecção de amostras anômalas através do gráfico de leverage versus resíduos..... | 53 |
| Figura 26. | Ajuste para as amostras de B100 adulteradas com álcool: (a) BES100 (b) BMS100(c) BER100 e (d) BMR100..... | 54 |
| Figura 27. | Norma do NAS versus valores de referência das concentrações para as amostras de calibração e validação..... | 55 |
| Figura 28. | Gráfico de erros para as amostras de B100 adulteradas com álcool. (a) BES100 (b), BMS100 (c), BER100 (d) e BMR100..... | 56 |
| Figura 29. | Gráfico de intervalo de confiança para as amostras B5 adulteradas com óleo. BES5(a), BMS5(b), BER5(c) e BMR5(d). | 57 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| 2. OBJETIVOS | 05 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 06 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 06 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 07 |
| 3.1 Biodiesel..... | 08 |
| 3.1.1 Definição e Produção..... | 08 |
| 3.1.2 Matéria-Prima..... | 11 |
| 3.1.3 Adulteração..... | 12 |
| 3.2 Espectroscopia no Infravermelho..... | 14 |
| 3.2.1 Aplicações da espectroscopia no infravermelho médio..... | 14 |
| 3.2.2 Espectroscopia de Reflectância Total Atenuada..... | 16 |
| 3.3 Calibração Multivariada..... | 18 |
| 3.3.1 Quimiometria..... | 18 |
| 3.3.1.1 Análise de Componentes Principais..... | 20 |
| 3.3.1.2 Análise por Quadrados Mínimos Parciais..... | 21 |
| 3.3.1.3 Detecção de Amostras Anômalas (outlier)..... | 23 |
| 3.4. Validação..... | 24 |
| 3.4.1 Cálculo do NAS (Sinal Analítico Líquido)..... | 25 |
| 3.4.2 Figuras de Mérito..... | 28 |
| 3.4.2.1 Exatidão..... | 28 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.4.2.2 | Ajuste do Modelo..... | 29 |
| 3.4.2.3 | Linearidade..... | 29 |
| 3.4.2.4 | Sensibilidade..... | 29 |
| 3.4.2.5 | Sensibilidade Analítica..... | 30 |
| 3.4.2.6 | Seletividade..... | 30 |
| 3.4.2.7 | Razão Sinal/Ruído..... | 31 |
| 3.4.2.8 | Testes para Erro Sistemático “bias” | 31 |
| 3.4.2.9 | Limites de Detecção e Quantificação..... | 32 |
| 3.4.2.10 | Intervalo de Confiança..... | 32 |
| 4. | PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 35 |
| 4.1 | Parte Experimental..... | 36 |
| 4.1.1 | Obtenção de Biodiesel..... | 36 |
| 4.1.2 | Obtenção dos Espectros..... | 38 |
| 4.1.3 | Construção dos Modelos PLS..... | 40 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 43 |
| 5.1 | Resultados e Discussão..... | 44 |
| 5.1.1 | Modelos B5..... | 44 |
| 5.1.2 | Modelos B100..... | 55 |
| 6. | CONCLUSÃO | 64 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Visando atender a demanda energética mundial o Brasil e outros países, intensificaram os estudos e investimentos para o desenvolvimento de combustíveis de fontes renováveis [1]. A utilização de biomassa como a cana de açúcar na produção de bioetanol combustível colocou o Brasil como um dos líderes na tecnologia de produção e transporte. A consolidação deste mercado potencializou o interesse na produção de biodiesel aproveitando a diversidade nas fontes oleaginosas presentes nos diferentes biomas nacionais [2]. Assim, desde 2005 o biodiesel foi incorporado na matriz energética brasileira e em 2010 tornou-se obrigatório o uso de 5% (v/v) de biodiesel misturado ao diesel do petróleo [3].

No Brasil, existem variadas fontes oleaginosas para a produção de biodiesel. Isso se deve, em parte, a biodiversidade, a extensão territorial e abundância de recursos hídricos disponíveis no país. A fonte de matéria-prima mais utilizada para a produção de biodiesel é o óleo de soja. Esta é a oleaginosa de maior importância no agronegócio nacional, sendo que o Brasil é o segundo maior exportador mundial [1-3]. Portanto, a soja apresenta o maior potencial para servir de modelo para o desenvolvimento de um programa nacional de biodiesel. Por outro lado, o uso de óleo residual ainda não representa o potencial desta matéria-prima que é, em sua maioria, descartada na rede de esgotos. Devido a sua baixa solubilidade em água, o óleo residual constitui como um fator negativo no que se refere à sua degradação em unidades de tratamento de esgotos por processos biológicos e, quando presentes em mananciais utilizados para abastecimento público, causam problemas no tratamento de água [4].

A produção de um biocombustível a partir deste resíduo traria inúmeros benefícios para a sociedade, pois reduziria problemas relacionados ao seu descarte, e seu aproveitamento reduziria o custo quanto à matéria-prima, além de aumentar a produção de biodiesel [5].

A reação de transesterificação a partir de um triglicerídeo e álcool na presença de catalisador consiste na rota tecnológica mais utilizada atualmente na produção de biodiesel [6,7]. Porém o rendimento reacional não atinge a conversão total podendo originar produtos indesejáveis como resíduo do álcool no biodiesel produzido. Por outro lado, devido ao menor custo do óleo vegetal, principalmente do óleo residual de processos de

frituras, em relação ao biodiesel, faz com que possam ocorrer adulterações pela adição destes óleos [8].

A determinação da concentração de etanol ou metanol em biodiesel é estabelecida pelas normas ABNT NBR 15343 e ASTM D6584, sendo realizada pela técnica de Cromatografia em Fase Gasosa com limite de 0,20% (m/m) de álcool no biodiesel. Por sua vez, a determinação do teor de glicerídeos em biodiesel é estabelecida pela norma ABNT NBR 15908, também usando Cromatografia em Fase Gasosa, com limites de 0,80% (m/m) para monoglicerídeo e 0,20% (m/m) para di ou triglicerídeo em biodiesel [9].

Embora as técnicas cromatográficas principalmente a cromatografia gasosa de alta temperatura com detecção de ionização em chama (HTGC/FID) sejam técnicas instrumentais bem estabelecidas, capazes de fornecer resultados de análises de biodiesel com precisão e exatidão, apresentam limitações devido à necessidade de preparo de amostras, consumo de reagentes, geração de resíduos e dificuldade quando aplicadas *in situ* para monitoramento da reação de transesterificação [8]. Neste contexto, análises espectroscópicas, especificamente no infravermelho apresentam como uma alternativa rápida, direta, não destrutiva, limpa e eficiente, podendo ser aplicadas *in situ* no controle de qualidade do biodiesel em todas as etapas da cadeia produtiva e fiscalização [10]. As potencialidades dessas técnicas tornam-se quase ilimitadas quando aliadas ao uso de métodos quimiométricos para extrair informações relevantes de dados complexos tornando-os mais simples de serem aplicados nas rotinas de laboratórios [11].

A validação é um processo de averiguação da confiabilidade de um método, com o intuito de avaliar se este apresenta uma eficiência para as condições nas quais será aplicado. O processo de validação deve ser realizado sempre que um procedimento analítico é proposto ou desenvolvido [12].

Nos últimos anos, uma considerável atenção vem sendo direcionada para a elaboração de guias, normas e trabalhos científicos que enfocam a necessidade da validação de modelos de calibração multivariada. Atualmente, já se encontram disponíveis trabalhos que descrevem procedimentos e propostas de como essa validação deve ser realizada. Alguns documentos apresentam caráter geral, enquanto que outros, como por exemplo, a norma ASTM E1655-05 descrevem especificamente o desenvolvimento e validação de modelos de calibração multivariada a partir da espectroscopia no infravermelho [13].

Diante deste contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento e validação de um método analítico para a quantificação de álcool em biodiesel e de óleo vegetal refinado e residual em misturas biodiesel/diesel utilizando a região espectral do Infravermelho Médio (MIR) e Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O projeto tem como objetivo geral, aplicar a técnica de espectroscopia na região do infravermelho médio (MIR) aliada ao método de calibração multivariada por quadrados mínimos parciais (PLS) visando desenvolver e validar métodos analíticos eficientes capazes de quantificar adulterantes (óleos vegetais, etanol e metanol) nos biodieseis, tanto metílico quanto etílico, de soja e óleo residual e em suas misturas com diesel, que possam ser acrescentadas em análises de rotina e controle de qualidade desse combustível por órgãos de fiscalização.

2.2 Objetivos Específicos

Construir modelos PLS para quantificar a adulteração de óleos de soja em B5 de soja tanto metílico quanto etílico na faixa de concentração de 0-30,00% (v/v).

Construir modelos PLS para quantificar a adulteração de óleo residual em B5 residual tanto metílico quanto etílico na faixa de concentração de 0-30,00% (v/v).

Construir modelos PLS para quantificar a adulteração de etanol em B100 etílico e residual na faixa de concentração de 0-1,00% (v/v).

Construir modelos PLS para quantificar a adulteração de metanol em B100 metílico residual na faixa de concentração de 0-1,00% (v/v).

Validar os modelos de calibração multivariada seguindo as recomendações da norma ASTM E 1655-05 e estimativas de figuras de mérito.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biodiesel

3.1.1 Definição e Produção

A oscilação no preço do petróleo, associado à queima de combustíveis fósseis tem dificultado o suprimento da demanda energética mundial. A busca por novas formas de energia vem ganhando destaque nas últimas décadas. No entanto, a preocupação ambiental tem sido objeto de discussões envolvendo diversos países. Esta conscientização tem reforçado a necessidade de outras fontes de energia. Atualmente o Brasil, devido sua riqueza e extensão territorial, utiliza diversas fontes de energia, como derivados de petróleo, gás natural, carvão mineral, eletricidade e biomassa, sendo que, mais de 66,0% das fontes de energia utilizadas no país são fontes não renováveis, e apenas 31,0% são renováveis como mostrado na Figura 1, baseada no Boletim Energético Nacional de 2013 (BEN) [14].

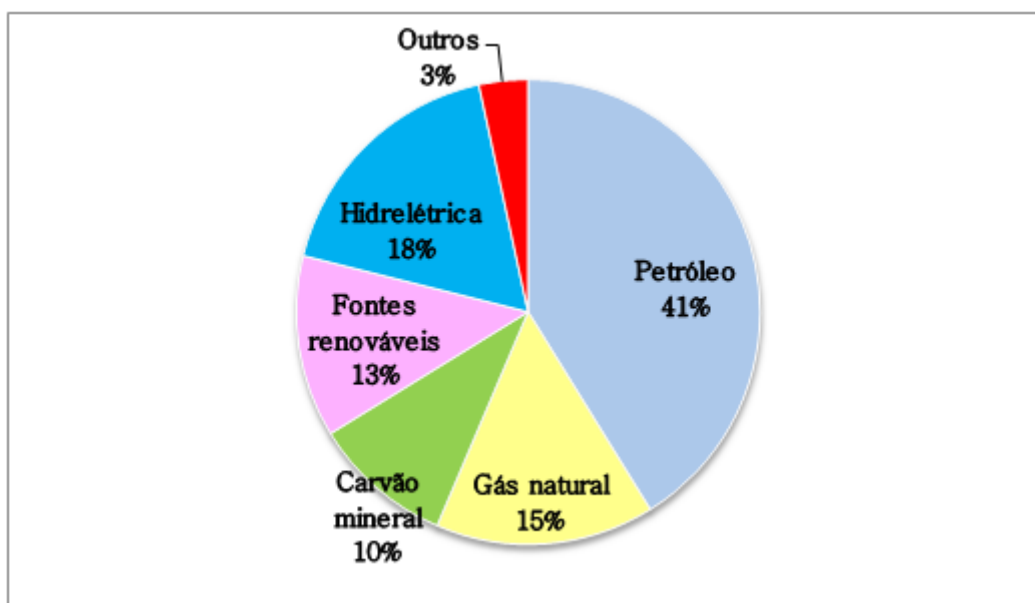


Figura1. Oferta de energia interna no país 2012 (BEN, 2013).

O uso da energia proveniente da biomassa é apontado como uma grande opção que poderia contribuir para o desenvolvimento ambiental, econômico e social do Brasil [15]. Diante disso, foi retomada a ideia da utilização dos óleos vegetais como combustíveis. Apesar de fatores favoráveis do ponto de vista energético, o óleo apresenta problemas tais como: combustão incompleta, formação de depósitos de carbono nos sistemas de injeção e

contaminação do óleo lubrificante [16]. A conversão de óleo vegetal em biodiesel tornou-se uma solução a estes problemas. Além disso, sua miscibilidade com o diesel possibilitou o uso na forma de misturas entre eles em diversas proporções.

O uso do Biodiesel apresenta importantes benefícios à sociedade, contribuindo na redução de emissão de gases durante o processo produtivo e resíduos sólidos na combustão, no aumento da geração de empregos principalmente na agricultura familiar e pequenos produtores. Do ponto de vista econômico, o biodiesel pode favorecer um equilíbrio na balança comercial uma vez que o diesel é o combustível mais consumido e a importação desse produto vem crescendo ao longo dos anos [17]. No entanto, o biodiesel possui maior viscosidade em relação ao diesel, o que pode causar problemas na injeção do combustível. Além disso, há uma redução de 4% na potência de um motor de quatro cilindros. Outra possível desvantagem é o custo de produção do biodiesel em relação ao óleo diesel [18].

De acordo com a Resolução nº 14 de 2012 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel é definido como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou gorduras animais conforme a especificação do Regulamento Técnico ANP nº 4/2012, que integra a referida resolução [9]. É um combustível biodegradável, proveniente de fonte renovável, apresenta uma maior viscosidade, lubricidade e ponto de fulgor, melhorando assim, a segurança durante o transporte e o manuseio do produto [16].

Dentre os álcoois existentes no processo de produção, os mais utilizados são, o metanol e o etanol. O metanol vem sendo amplamente proveitoso, pois apresenta maior reatividade que o etanol, o que implica em menor tempo e temperatura de reação. O etanol, porém, é consideravelmente menos tóxico e pode ser obtido a partir de fontes renováveis. Além disso, produz um biodiesel com maior índice de cetano e possui uma produção consolidada no Brasil [15]. Uma grande desvantagem do etanol é que promove uma maior dispersão do glicerol no biodiesel dificultando a separação das fases, e, consequentemente, requer uma maior razão molar álcool/óleo para aumentar o rendimento da reação.

Diferentes fatores podem afetar a reação, como: o catalisador, a razão molar álcool/óleo, o tipo de álcool, a temperatura da reação e a velocidade de agitação, além da qualidade da matéria-prima utilizada [18]. A reação geralmente empregada a nível industrial utiliza uma razão molar óleo: álcool de 1:6, na presença de aproximadamente 0,40% (m/m) de catalisador. O excesso de álcool faz-se necessário para deslocar o

3. Revisão Bibliográfica

equilíbrio estabelecido na reação em direção à formação de biodiesel [19]. E, para o melhor rendimento da reação são utilizados catalisadores homogêneos alcalinos. A Figura abaixo mostra de forma generalizada a reação de conversão do triglicerídeo em biodiesel [20].

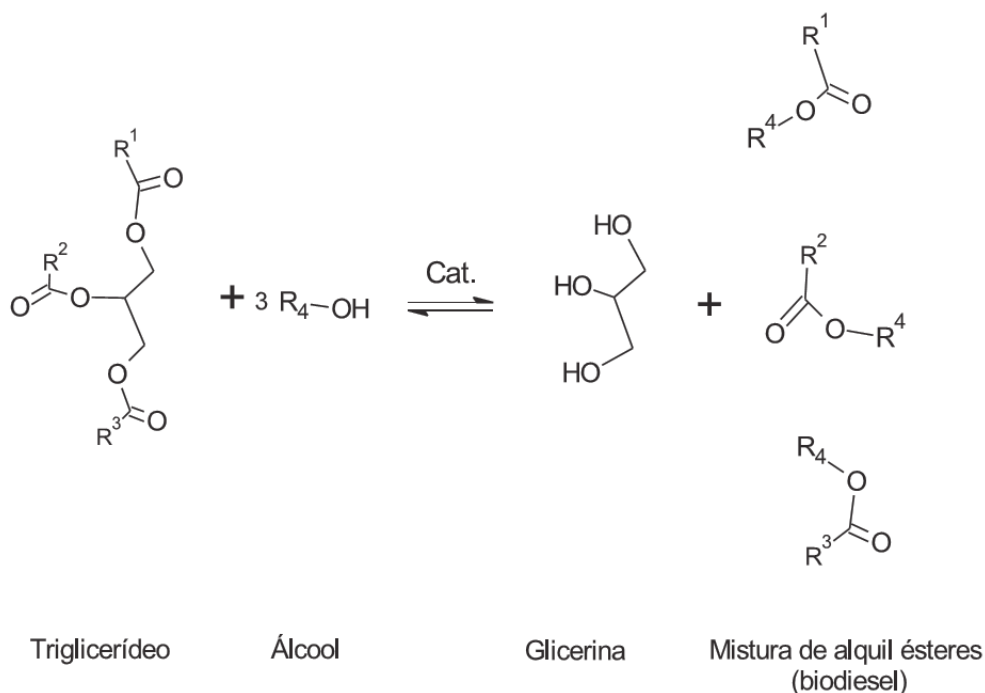


Figura 2. Reação global de transesterificação.

O biodiesel é perfeitamente miscível e físico-quimicamente semelhante ao diesel do petróleo podendo ser utilizado puro ou misturado em diferentes proporções. Esta mistura é possível porque em pequena proporção não é necessário alterar a estrutura do motor. As notações B0 e B100 designam respectivamente o óleo diesel e o biodiesel e suas misturas binárias são genericamente denominadas de BX, onde X é a porcentagem de biodiesel no diesel [22]. No Brasil, desde janeiro de 2005, de acordo com a Lei nº 11.097, o Biodiesel está inserido na matriz energética de acordo com o Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB) do Governo Federal. A partir do ano de 2010, passa a ser obrigatória a adição de 5% (v/v) de biodiesel ao diesel (B5) [9].

3.1.2 Matérias-primas

As fontes de matérias-primas de oleaginosas mais utilizadas para a produção de biodiesel são: soja, algodão, palma e canola. Além de óleos vegetais usam-se gorduras bovina, suína, frango e óleo de fritura. A escolha da matéria-prima é fator preponderante nos custos da produção do biodiesel, podendo definir a viabilidade ou não do processo. Portanto deve-se levar em conta aspectos como: a composição química do óleo extraído, o elevado rendimento energético por unidade de área e a produção abundante de óleos a custos reduzidos [23].

De acordo com a ANP: 69,82% da produção de biodiesel no Brasil entre Janeiro e Agosto de 2013 é proveniente do óleo de soja. Em segundo lugar aparece o sebo bovino com 22,24% seguido do óleo de algodão com 2,66%. Em pequena quantidade se encontram as gorduras de porco e de frango, além de óleos de frituras e outros óleos vegetais com 5,28% [24].

A Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE) estima que a produção de biodiesel no país em 2013 é da ordem de 1,15 bilhões de litros, aproveitando a maior safra de soja dos últimos anos. Isso demonstra o potencial desta oleaginosa em consolidar o mercado do biodiesel. Já o sebo bovino representou no início deste ano, cerca de 1/5 da produção de biodiesel e o algodão vêm aumentando sua produção devido a incentivos na cultura agrícola [4]. Outro mercado que está ganhando espaço é o de óleo de fritura, pois reduz o custo da matéria-prima visto que não há necessidade de extração e refino desse óleo [19]. Um levantamento primário da oferta de óleos residuais de frituras, suscetíveis de serem coletados, revela um potencial de oferta no país superior a 30 mil toneladas por ano [25]. Supondo um rendimento de apenas 80% na transesterificação do óleo residual, poderiam atingir uma produção de 24 mil toneladas por ano de biodiesel. Entretanto nos dias atuais apenas 3,0% do óleo residual descartado é reaproveitado, significando uma perda de aproximadamente 23,28 mil toneladas de biodiesel por ano [9]. Outro aspecto relevante consiste na minimização de impactos ambientais uma vez que pesquisas apontam que a cada litro de óleo despejado no esgoto tem capacidade de poluir mais de 25 mil litros de água [26]. Estudos demonstram que o custo no tratamento de efluentes pode aumentar em torno de 40% com a presença de óleo residual [9].

Nos últimos dez anos têm-se intensificado a pesquisa visando identificar novas oleaginosas e diferentes processos de produção de biodiesel que viabilizem e reduzam o

custo deste biocombustível. Diante deste cenário, a partir de 2007, o Laboratório de Biocombustíveis da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO-UFU), com sede no Instituto de Química, sob a coordenação do Professor Doutor Manuel Gonzalo Hernandez-Terrones (*in memoriam*), vem desenvolvendo pesquisas para avaliar o potencial de diversas oleaginosas das regiões do cerrado e Norte de Minas Gerais e processos de produção e caracterização de biodieseis obtidos através da transesterificação via rotas metélica [27] e etélica [28], obedecendo a critérios estabelecidos pela ANP. As matérias-primas testadas no processo de produção de biodiesel foram: pinhão-manso, pequi, baru, macaúba, girassol, canola, algodão, milho, soja, óleo residual e sebo bovino [29]. Em 2009 o Professor Doutor Waldomiro Borges Neto criou o Laboratório de Quimiometria do Triângulo (LQT) dando início à parceria com o LABIO-UFU em pesquisas visando à otimização multivariada dos parâmetros de produção de biodieseis [30], desenvolvimento de algoritmos matemáticos para determinação de coeficientes de expansão térmica e volumétricos para diferentes biodieseis [31,32], e posteriormente o desenvolvimento e validação de métodos baseados na aplicação de técnicas analíticas [33] aliadas aos métodos quimiométricos para controle de qualidade de biodieseis e suas misturas com diesel [34]. Os grupos participam do programa de Pós-Graduação em Química do IQUFU e integram redes de pesquisas em Minas Gerais como: Rede de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Biocombustíveis de Minas Gerais; Rede Mineira de Química (RQ-MG) e Rede de Laboratórios de Biocombustíveis de Minas Gerais (RLBio-MG), contribuindo principalmente na formação profissional e acadêmica a níveis de graduação, mestrado e doutorado.

3.1.3 Adulteração

A produção de biodiesel possui um custo mais elevado que o diesel mineral devido à fase prematura da sua cadeia produtiva, para que sua comercialização seja viável o governo concede isenções e reduções em seus impostos. Tais incentivos fiscais podem de certa forma despertar interesses econômicos quanto à sua adulteração ou das misturas com diesel, pela adição fraudulenta de materiais miscíveis e com menor valor comercial como óleos vegetais, óleo residual, álcoois e solventes [35].

3. Revisão Bibliográfica

A adulteração e/ou falsificação de produtos ocorre principalmente com aqueles produtos de alto valor comercial e/ou alto volume de comercialização como, por exemplo, os combustíveis. Devido à possibilidade de adulteração de combustíveis e a carência de uma metodologia rápida, barata e confiável para o monitoramento destas novas misturas tem-se investigado metodologias alternativas visando manter a qualidade deste combustível para o consumidor.

No gráfico da Figura 3 podemos visualizar a relação entre a não conformidade quanto ao teor de biodiesel e outras não conformidades do Diesel B (Diesel metropolitano) que difere do Diesel Tipo A por possuir no máximo 0,5% de enxofre e sua comercialização permitida somente nas regiões metropolitanas. Segundo o Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis, em abril de 2013, a ANP analisou 7.889 amostras de diesel B5 comercializadas, onde constatou que o teor de biodiesel fora das especificações representou 16,1% do total de não conformidades [24].

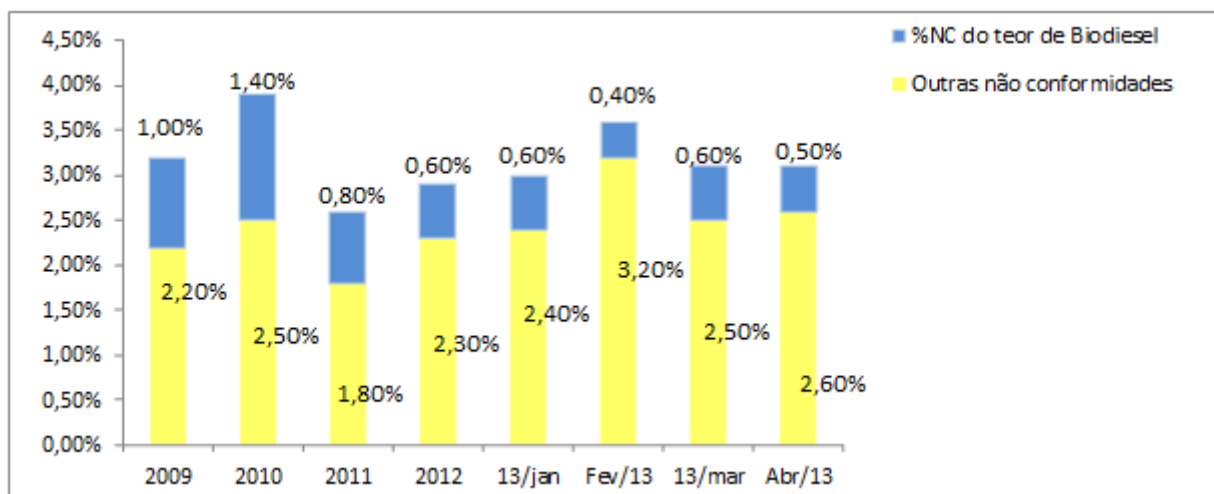


Figura 3. Não conformidades de Diesel B.

Apesar das ações de monitoramento da qualidade de combustíveis, a comercialização fora das especificações tem sido uma prática constante. Com o uso de combustível adulterado, os veículos a diesel diferentemente dos veículos à gasolina e álcool, que sofrem um desgaste percebido em longo prazo, sofrem problemas instantâneos, provocando: aquecimento e aceleração do motor, entupimento dos bicos injetores e do filtro de combustível, má dirigibilidade, perda de potência, danos ao sistema de injeção, contaminação do óleo lubrificante, aparecimento de borra no tanque e corrosão [36,37].

Assim, é de fundamental importância no controle de qualidade desse combustível, a quantificação de adulterantes que podem estar presentes no biodiesel puro (B100) ou nas misturas de biodiesel/diesel (B5) comercializadas, atestando a conformidade da amostra analisada frente às especificações estabelecidas na Resolução ANP N° 14/2012 [9].

O tema “adulteração de combustíveis” vem despertando crescente interesse por parte de pesquisadores que a cada dia apresentam na literatura científica relevante contribuições como as citadas a seguir.

Kumar e Mishra, [38] quantificaram etanol em gasolina, biodiesel e misturas de biodiesel/diesel por espectrofluorimetria e calibração multivariada por Regressão por Componentes Principais (PCR) e PLS. Os melhores valores de RMSEC (Erro Quadrático Médio de Calibração) foram de 0,79 e RMSEP (Erro Quadrático Médio de Previsão) de 0,52 para os modelos PLS.

Brandão e seus colaboradores em um dos seus trabalhos quantificaram óleos vegetais em diesel através de HPLC aliado a técnicas quimiométricas. Análise de Componentes Principais (PCA), Método do K-ésimo Vizinho Mais Próximo (KNN) e PLS e calculou a precisão média e a concentração mínima detectada. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) aliada a métodos quimiométricos mostrou grande potencial e confiabilidade para a determinação de óleos e gorduras usados para o controle de qualidade [39].

3.2 Espectroscopia no Infravermelho Médio

3.2.1 Aplicações da Espectroscopia no Infravermelho Médio

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Normalmente, as transições eletrônicas são situadas na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de micro-ondas e, em casos particulares, também na região do Infravermelho distante.

A região do infravermelho médio é muito utilizada e se estende de cerca de 4.000 a 200 cm^{-1} em que os espectros são empregados tanto para análise quantitativa como qualitativa [40]. A região do infravermelho próximo, de 12.800 a 4.000 cm^{-1} é também usada em determinação quantitativa em rotina de certas espécies como água, dióxido de

3. Revisão Bibliográfica

carbono, enxofre e outros compostos utilizados na indústria e agricultura. Já no infravermelho distante, de 200 a 10 cm^{-1} , o uso tem sido na determinação de estruturas de espécies inorgânicas e organometálicas, com base em medidas de absorção. A Tabela 1 apresenta os limites aproximados para cada região [41].

Tabela 1. Regiões espectrais do infravermelho.

| Região | Número de onda (ν), cm^{-1} | Comprimento de onda (λ), nm | Frequência (ν), Hz |
|-----------------------|--|---------------------------------------|---|
| Próximo (NIR) | 12.800 a 4.000 | 780 a 2.500 | $3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$ |
| Médio (MIR) | 4.000 a 200 | 2.500 a 5.000 | $1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$ |
| Distante (FIR) | 200 a 10 | 5.000 a 100.000 | $6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$ |

Os espectros na região do infravermelho médio apresentam bandas intensas e os picos com absorvâncias bastante altas, o que facilita a interpretação dos espectros. A faixa dos espectros MIR conhecida como região digital ($1.200\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$) é bastante útil para a identificação de compostos, visto que pequenas diferenças na estrutura e na constituição das moléculas resultam em mudanças significativas no perfil e na distribuição dos picos de absorção. Deste modo, é possível identificar, por exemplo, um composto orgânico comparando-se seu espectro com bancos de dados pré-existent [42].

A Figura 4 mostra os espectros do diesel, biodieseis e óleos. Analisando a figura, os padrões de absorção dos espectros de biodieseis e óleos diferem em maior grau na região de impressão digital, inferior a 1.500 cm^{-1} .

A banda ao redor de 1.655 cm^{-1} pode ser atribuída às vibrações de deformação axial da ligação C=C, característica de alquenos e a banda em cerca de 3.010 cm^{-1} às vibrações de deformação axial da ligação C-H da ligação dupla. Observa-se a presença de um pico de absorbância na faixa de 1.700 cm^{-1} a 1.750 cm^{-1} , proveniente da presença de carbonila (C=O) e a presença de bandas na região de 1.000 cm^{-1} a 1.300 cm^{-1} atribuída às vibrações de deformação axial da ligação C-O. Os ésteres metílicos possuem absorção com três bandas na região de 1.165 cm^{-1} a 1.265 cm^{-1} , ao passo que na mesma região para o éster etílico sobressaem duas bandas. O espectro do diesel apresenta essencialmente bandas de absorção correspondentes aos modos vibracionais característico de alcanos normais. São três regiões espectrais de absorção significativas. A região entre 2.840 cm^{-1} e 3.000 cm^{-1} é atribuída às vibrações de deformação axial das ligações C-H dos grupamentos de metila e

3. Revisão Bibliográfica

metileno. Bandas de intensidade intermediária na região de 1.300 cm^{-1} a 1.500 cm^{-1} proveniente das vibrações de deformação angular das ligações C-H do grupo metila e metileno. Outra banda de baixa intensidade, porém relevante na região de 720 cm^{-1} proveniente das vibrações de deformação angular assimétrica resultante das deformações C-H do grupamento metileno [41].

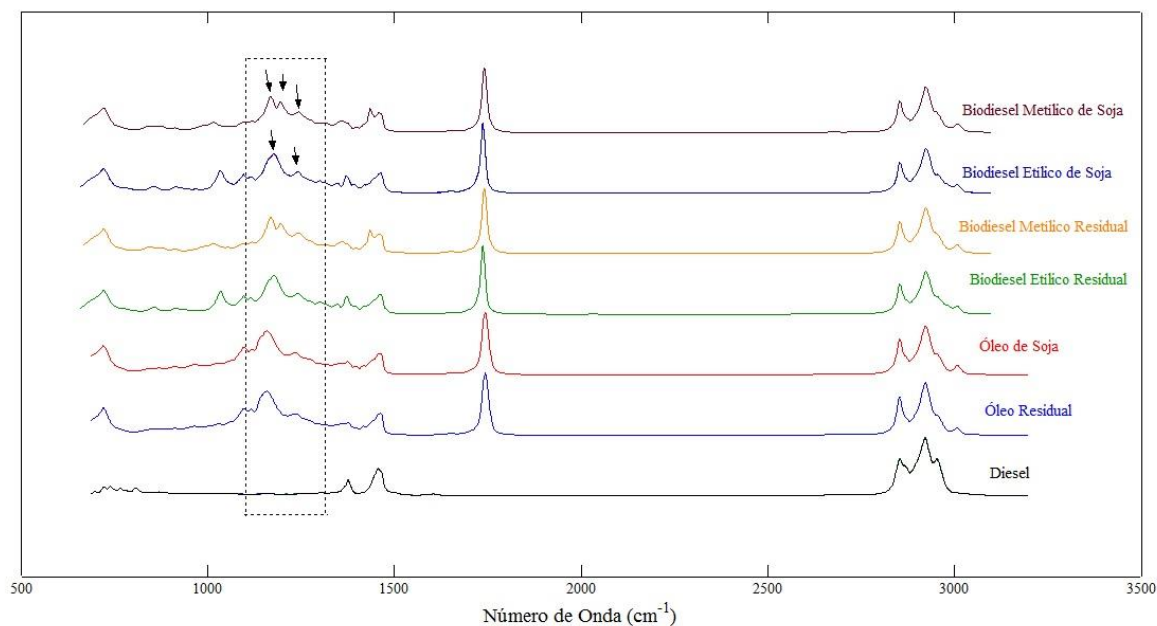


Figura 4. Espectros dos biodieseis etílicos e metílicos de soja e residual, óleos de soja e residual e diesel.

3.2.2 Espectroscopia de Reflectância Total Atenuada

A reflexão de radiação pode ser de quatro tipos: especular, difusa, interna e total atenuada (ATR). A espectroscopia de ATR (Figura 5) baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um menos denso (amostra) ocorre uma reflexão. Consiste no contato da amostra com um elemento de reflexão interna construída com um material de alto índice de refração, normalmente o seleneto de zinco (ZnSe). A fração do feixe incidente que é refletida aumenta com o ângulo de incidência ocorrendo à reflexão total. Nesse processo, o feixe se comporta como se penetrasse um pouco no meio menos denso antes que a reflexão ocorra. A profundidade de penetração, que varia de uma fração até vários comprimentos de onda, depende do

3. Revisão Bibliográfica

comprimento de onda da radiação incidente, dos índices de refração dos dois materiais e do ângulo do feixe incidente em relação à interface. A radiação penetrante é chamada onda evanescente [43]. Se o meio menos denso absorve essa onda evanescente, ocorre atenuação do feixe nos comprimentos de onda das bandas de absorção [41].

Nas unidades de ATR horizontais, o número de reflexões da radiação infravermelha em cada superfície do cristal está usualmente entre cinco e dez, dependendo do comprimento e da espessura do cristal e do ângulo de incidência. A técnica de refletância total atenuada revolucionou em anos recentes as análises de amostras líquidas e sólidas porque combate os aspectos mais desafiadores da análise em infravermelho, nomeadamente a preparação de amostras e a reprodutibilidade espectral [67].

Os espectros de ATR são semelhantes, mas não iguais aos espectros comuns de absorção. Em geral, enquanto as mesmas bandas são observadas, suas intensidades relativas diferem. As absorvâncias, embora dependam do ângulo de incidência, são independentes da espessura da amostra, uma vez que a radiação penetra apenas alguns micrômetros na mesma.

Uma das maiores vantagens da espectroscopia de ATR é que os espectros de absorção são obtidos rapidamente em uma grande variedade de tipos de amostras com um mínimo de preparação. Assim, linhas, fios, tecidos, fibras, pós, pastas, suspensões, polímeros, borrachas e outros materiais podem ser analisados pressionando as amostras sobre o cristal ATR [41]. Além disso, é uma técnica analítica não-destrutiva que permite a determinação rápida, direta e segura de diversas propriedades, sem pré-tratamento da amostra [44].



Figura 5. ATR horizontal e espectrofotômetro FT-MIR, respectivamente.

Apesar da espectroscopia no infravermelho médio fornecer informações químicas características de cada composto, os espectros podem conter sobreposição de sinais que dificultam a interpretação dos mesmos [43]. Em vista disso, torna-se imprescindível a associação da análise multivariada.

3.3 Calibração Multivariada

3.3.1 Quimiometria

A Quimiometria pode ser definida como a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos assim como lógica, para o tratamento de dados químicos de forma a extrair uma maior quantidade de informação e otimização dos resultados analíticos [45]. Conforme o objetivo de estudo, a quimiometria pode ser dividida em várias áreas como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, métodos de inteligência artificial, calibração multivariada, dentre outras, sendo a calibração a principal linha de pesquisa na quimiometria [45].

A calibração é definida como o processo que permite estabelecer a relação entre a resposta instrumental (sinal analítico), e uma determinada propriedade da amostra (concentração) [46]. O modelo de calibração é uma função matemática (f) que relaciona dois grupos de variáveis, sendo uma delas denominada dependente (y) e a outra denominada independente (X) conforme demonstrado pela Equação 1.

$$y = f(X) = Xb \quad (1)$$

Esta etapa é empregada na calibração e, por isso, denomina-se conjunto de calibração. Os parâmetros do modelo são denominados coeficientes de regressão (b) determinados a partir de dados experimentais [47].

O passo seguinte à calibração é a validação que consiste em verificar se o modelo é ou não realístico. Na validação há uma utilização de amostras cujas variáveis dependentes sejam conhecidas para que se estabeleça uma comparação entre os valores previstos pelo modelo e os valores conhecidos através de uma metodologia padrão, avaliando a desempenho do modelo proposto [48].

3. Revisão Bibliográfica

Uma das vantagens da calibração multivariada frente à univariada é a possibilidade de análises mesmo na presença de interferentes, desde que estejam presentes nas amostras utilizadas para a construção do modelo de calibração. Outras possibilidades apresentadas por esse tipo de calibração são determinações simultâneas e análises mesmo sem resolução de sinal analítico. Quando métodos univariados não podem ser aplicados, os modelos de calibração multivariada tornam-se então uma alternativa promissora [48].

A Figura 6 ilustra como uma matriz de dados \mathbf{X} pode ser construída a partir de um vetor de medidas instrumentais em que as “n” linhas correspondem a diferentes amostras e as “m” colunas as variáveis (absorvância de um composto em diferentes números de onda).

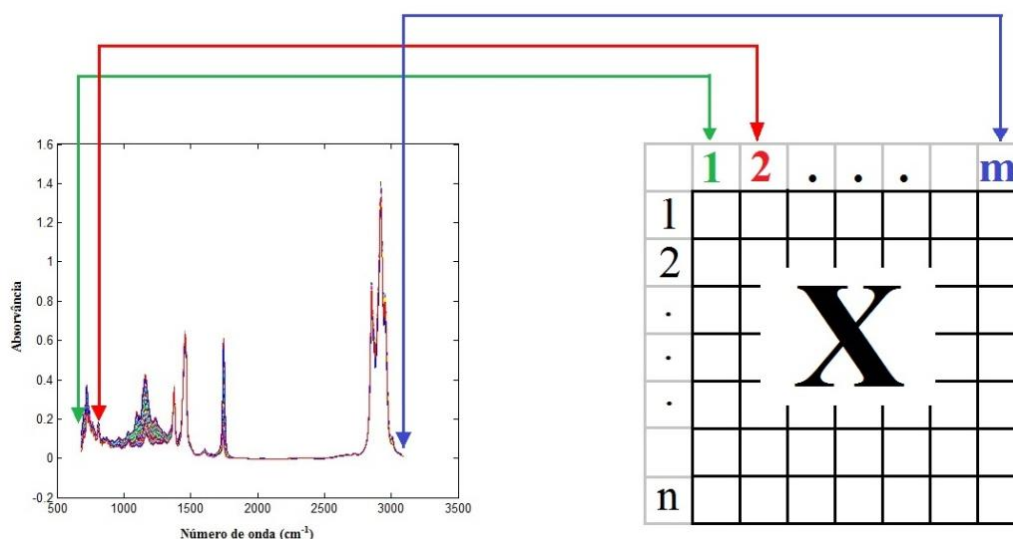


Figura 6. Representação da construção da matriz \mathbf{X} para calibração multivariada.

Vários métodos multivariados são utilizados em química analítica para a construção de modelos. Os métodos mais empregados são: Regressão Linear Múltipla (MLR), PCR [47] e PLS, que tem por objetivo o ajuste linear entre as variáveis. O método MLR utiliza valores de absorvância em número de ondas selecionados. Já o PCR e PLS são métodos de modelagem global. Nesse trabalho, trataremos de PLS, porém iremos introduzir o conceito de PCA, uma vez que nessa regressão, utiliza-se a PCA como método de ortogonalização de vetor.

3.3.1.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

Na análise de componentes principais ocorre a projeção dos dados originais de dimensão especial para dimensões menores. Esta projeção pode ser realizada, além de outros métodos, pela PCA em que o objetivo é transformar dados complexos para que as informações importantes possam ser visualizadas mais facilmente [47,49]. Nesse caso, a matriz \mathbf{X} é decomposta em duas matrizes menores de escores (\mathbf{T}) e de pesos (\mathbf{P}) e mais uma matriz de resíduos que indica a parte que não é modelada, como mostra a Figura 7.

O diagrama ilustra a equação de decomposição da matriz \mathbf{X} em matrizes \mathbf{T} , \mathbf{P}^T e \mathbf{E} . A matriz \mathbf{X} é representada por um retângulo com dimensões m (altura) e n (largura). Ela é igual a um produto de matrizes \mathbf{T} e \mathbf{P}^T , mais uma matriz \mathbf{E} . A matriz \mathbf{T} tem dimensões m e d . A matriz \mathbf{P}^T tem dimensões d e n . A matriz \mathbf{E} tem dimensões m e n .

$$\begin{matrix} & n \\ \boxed{\mathbf{X}} & \\ m & \end{matrix} = \begin{matrix} & d \\ \boxed{\mathbf{T}} & \\ m & \end{matrix} \begin{matrix} & n \\ \boxed{\mathbf{P}^T} & \\ d & \end{matrix} + \begin{matrix} & n \\ \boxed{\mathbf{E}} & \\ m & \end{matrix}$$

Figura 7. Decomposição da matriz \mathbf{X} nas matrizes de escores (\mathbf{T}), pesos (\mathbf{P}) e resíduos (\mathbf{E}).

Neste caso, \mathbf{X} é a matriz original constituída de “ m ” linhas (amostras) e “ n ” colunas (variáveis); \mathbf{T} é a matriz de escores com “ m ” linhas e “ d ” colunas (número de componentes principais); \mathbf{P} é a matriz de pesos com dimensões “ d ” e “ n ” em que d é o numero de linhas e “ n ” o de colunas e \mathbf{E} é a matriz de resíduos com “ m ” linhas e “ n ” colunas.

As componentes principais são determinadas baseadas no critério de variância máxima. Cada componente principal subsequente descreve um máximo de variância contida nos dados, sendo que a primeira componente principal determina a maior variância dos dados. Na segunda componente principal, há menos informação do que na primeira e, assim, sucessivamente. A Figura 8 representa graficamente duas componentes principais no caso de 2 variáveis (x_1 e x_2) em que a maior variância dos dados está sendo explicada pela primeira componente principal (PC_1).

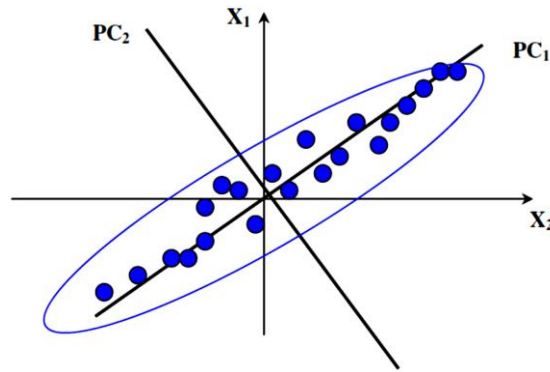


Figura 8. Representação de duas Componentes Principais.

Geralmente a variância dos dados é explicada na ordem decrescente, ou seja, $PC_1 > PC_2 > PC_3 > \dots > PC_A$, o que torna possível a visualização dos dados através dos escores de um componente versus outro. Os escores e os pesos podem ser calculados segundo o algoritmo NIPALS [49] ou SIMPLS [50].

3.3.1.2 Análise por Quadrados Mínimos Parciais (PLS)

O PLS é o método de regressão mais utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada. Este método não requer um conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras, podendo realizar a previsão de amostras mesmo na presença de interferentes. Porém estes interferentes também devem estar presentes por ocasião da construção do modelo [48]. No PLS, a informação de y é incorporada, de forma que cada PC do modelo sofre uma pequena modificação para buscar a máxima covariância entre X e y e passa a receber a terminologia de Variável Latente (VL) conforme mostrado na Figura 9.

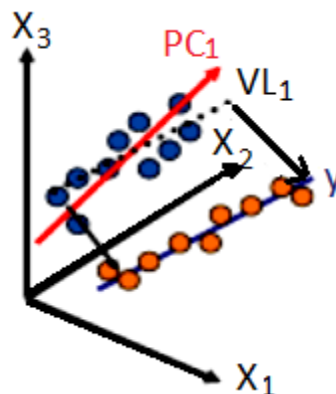


Figura 9. Rotação no eixo da PC (Variável Latente).

3. Revisão Bibliográfica

O modelo PLS é obtido através de um processo iterativo, no qual se otimiza ao mesmo tempo a projeção das amostras sobre o(s) peso(s), para a determinação dos escores, e o ajuste por uma função linear dos escores da matriz \mathbf{X} aos escores do vetor \mathbf{y} de modo a minimizar os desvios. Essa otimização simultânea ocasiona pequenas distorções nas direções dos pesos, de modo que, rigorosamente eles perdem a ortogonalidade, levando a pequenas redundâncias de informação. Porém, são essas pequenas redundâncias que otimizam a relação linear entre os escores, e estas distorções da ortogonalidade entre os componentes principais no PLS fazem com que não sejam mais componentes principais (que são ortogonais) e sim variáveis latentes (VL) [45,48].

\mathbf{y} é um vetor de dimensão $(m \times z)$, em que z é o número de colunas de \mathbf{y} . Tem-se a decomposição de ambas as matrizes \mathbf{X} de dimensão $(m \times n)$ e \mathbf{y} em suas matrizes de escores e pesos conforme as Equações 2 e 3:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E}_X \quad (2)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}\mathbf{Q}^T + \mathbf{E}_Y \quad (3)$$

Onde \mathbf{X} é a matriz de dados (medida instrumental), \mathbf{y} é o vetor de resposta (concentração, por exemplo), \mathbf{T} e \mathbf{U} são os escores para as duas matrizes de dados, \mathbf{P} e \mathbf{Q} são os respectivos pesos, \mathbf{E}_X e \mathbf{E}_Y são os respectivos resíduos, ou seja, as matrizes que contem a parte não modelada [45, 48,51].

Uma relação linear é, então, estabelecida entre os escores de \mathbf{X} e os escores de \mathbf{y} para cada VL ($h=1,2, \dots, A$) [52].

$$\mathbf{u}_h = \mathbf{b}_h \mathbf{t}_h \quad (4)$$

Em que, \mathbf{b}_h é o vetor de coeficientes de regressão do modelo linear para cada VL, obtido através da Equação 5.

$$\mathbf{b}_h = \frac{\mathbf{u}_h^T \mathbf{t}_h}{\mathbf{t}_h^T \mathbf{t}_h} \quad (5)$$

O melhor modelo deverá minimizar as matrizes de resíduos \mathbf{E}_X e \mathbf{E}_Y e ao mesmo tempo, obter uma relação linear entre \mathbf{t} e \mathbf{u} .

Para a determinação do número correto de VL o método mais utilizado é o de validação cruzada, o qual se baseia na habilidade de previsão de um modelo construído por parte de um conjunto de dados seguido pela previsão do restante do conjunto de dados, que é realizada pelo modelo construído. A validação cruzada pode ser realizada em blocos, ou seja, um número determinado de amostras é deixado de fora no processo de construção do modelo e a seguir essas amostras são previstas pelo modelo construído, ou ainda por um caso conhecido como “leave-one-out” (deixe uma fora por vez), em que uma amostra é deixada de fora no processo de construção do modelo e a seguir essa amostra é prevista pelo modelo construído. Em ambos os casos, o processo é repetido até que todas as amostras tenham sido previstas e o RMSECV é calculado de acordo com a Equação 6 [46,49].

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n-1} (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad (6)$$

onde \hat{y}_i e y_i são, respectivamente, os valores previstos e de referência para a propriedade de interesse.

O cálculo é realizado para o número de componentes de 1 até A, e os resultados de RMSECV são mostrados em um gráfico de RMSECV contra o número de variáveis latentes. 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 variáveis latentes que produziu um baixo erro de previsão sem perda significativa da variância dos dados.

3.3.1.3 Determinação de Amostras Anômalas (outlier)

Na construção do modelo de calibração multivariada em que são dois conjuntos de amostras (calibração e validação), há a possibilidade de ocorrência de amostras que tenham o comportamento muito diferente comparado com o restante do conjunto [45]. A presença deste tipo de amostra leva à construção de modelo com baixa capacidade de previsão. Para identificar amostras dessa natureza existem vários métodos dentre eles a que se baseia na

análise da influência da amostra dentro do conjunto recomendada pela norma ASTM E1655-05.

Outlier é o termo utilizado para designar amostras anômalas que podem estar presentes no modelo. Geralmente amostras anômalas são avaliadas com base no leverage (o grau que uma amostra está distante da média do conjunto de dados) e nos resíduos não modelados nos dados espectrais ou nos valores de concentração analítica [47].

3.4. Validação

Na química analítica, uma das práticas mais frequentes é a medida quantitativa de uma propriedade de interesse, que na maioria dos casos, trata-se da concentração de uma espécie presente no meio. Quando apenas uma medida instrumental é utilizada para cada uma das amostras, denomina-se calibração univariada. É um método fácil de ser aplicado, validado e se encontra vários trabalhos na literatura [53]. Por outro lado, na calibração multivariada, mais especificamente, em dados de primeira ordem têm-se duas ou mais respostas relacionadas com a propriedade de interesse. Esse método permite análises mesmo com interferentes, desde que estejam presentes nas amostras de calibração [11].

No entanto, sempre que um método é proposto, existe a necessidade de averiguar se ele é adequado para as condições nas quais será aplicado. Esse procedimento de averiguação é denominado validação. A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Esse método deve atender às normas impostas por órgãos de fiscalização nacionais e internacionais [12]. As agências nacionais reguladoras do processo de validação são: INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Embora existam trabalhos na Literatura utilizando métodos espectroscópicos aliados a métodos multivariados, porém, poucos são validados [13]. Com a crescente utilização desses modelos, cria-se a necessidade do desenvolvimento de guias, normas e trabalhos científicos que enfocam a validação de modelos de calibração multivariada. Alguns documentos apresentam caráter geral, enquanto que outros, como, por exemplo, a norma ASTM E1655-05, descreve especificamente o desenvolvimento e validação de modelos de calibração multivariada a partir da espectroscopia no infravermelho.

A validação pode ser atestada também pela determinação de parâmetros conhecidos como figuras de mérito recomendados pela IUPAC. Para avaliar algumas figuras de mérito é necessário o cálculo do NAS (sinal analítico líquido) que também se encontra nas recomendações da IUPAC. As principais figuras de mérito são: exatidão, ajuste do modelo, linearidade, sensibilidade, sensibilidade analítica, seletividade, razão sinal/ruído, testes para erro sistemático “bias”, limite de detecção e quantificação e intervalo de confiança.

3.4.1 Cálculo do NAS

Para discutir figuras de mérito, é necessário introduzir o conceito de Sinal Analítico Líquido (NAS). Em calibração multivariada, o NAS exerce uma importante função da determinação de figuras de mérito. O conceito NAS surge naturalmente em calibração multivariada, a partir do fato que o espectro de uma amostra possui contribuições de outros componentes da mesma. Assim, é lógica a decomposição do espectro em duas partes ortogonais: uma que contém o sinal oriundo unicamente do analito de interesse (NAS), e a parte remanescente que contém a contribuição de outros componentes da amostra. Esta decomposição é realizada por vários algoritmos de regressão, de tal forma que o NAS é proporcional à concentração do analito de interesse. A decomposição do espectro é mostrada na Figura 10 [54].

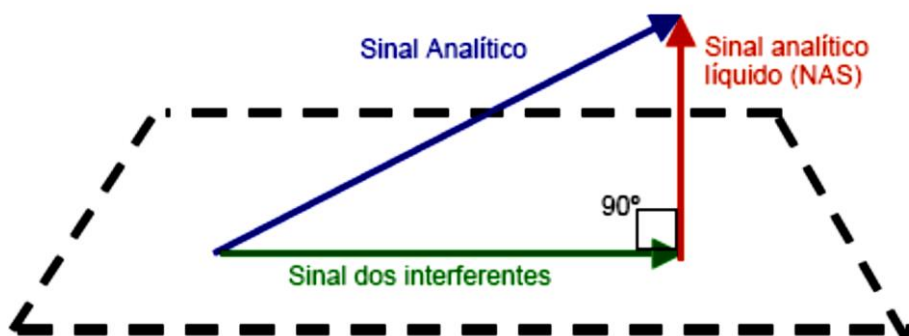


Figura 10. Representação geométrica da decomposição do sinal analítico.

Para o cálculo do NAS, primeiramente, \mathbf{X} e \mathbf{y} são reconstruídos com A variáveis latentes, gerando $\hat{\mathbf{X}}_A$ e $\hat{\mathbf{y}}_A$, segundo as Equações 7 e 8.

$$\hat{\mathbf{X}}_A = \mathbf{T}_A \mathbf{P}_A^T + \mathbf{E} \quad (7)$$

3. Revisão Bibliográfica

$$\hat{\mathbf{y}}_a = \mathbf{U}_a \mathbf{q}_a + \mathbf{f} \quad (8)$$

em que, \mathbf{T} e \mathbf{u} são os *escores*, \mathbf{P} e \mathbf{q} são os pesos e \mathbf{E} e \mathbf{f} representa o erro de decomposição da matriz \mathbf{X} e do vetor \mathbf{y} , respectivamente.

O próximo passo é a determinação da matriz $\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}$, que contém a informação de todas as espécies presentes na amostra exceto a informação referente à espécie k . Essa determinação é realizada através de uma projeção ortogonal baseada na operação matricial que estabelece que para uma matriz \mathbf{X} qualquer, a matriz $\mathbf{X}\mathbf{X}^+$ (onde “+” indica a matriz pseudo-inversa de Moore-Penrose) é uma matriz de projeção com as propriedades mostradas pelas Equações 9 e 10 [55].

$$\mathbf{X} = (\mathbf{X}\mathbf{X}^+)\mathbf{X} \quad (9)$$

$$\mathbf{X}^+ = \mathbf{X}^+(\mathbf{X}\mathbf{X}^+) \quad (10)$$

A partir dessas propriedades, se qualquer vetor \mathbf{z} for uma combinação linear da matriz \mathbf{X} , a multiplicação de \mathbf{z} pela matriz $\mathbf{X}\mathbf{X}^+$ fornecerá como resultado o próprio vetor \mathbf{z} . No entanto, a multiplicação de \mathbf{z} por $(\mathbf{I}-\mathbf{X}\mathbf{X}^+)$, (onde \mathbf{I} representa a matriz identidade de dimensões adequadas) resultará em um vetor de zeros. Assim, a multiplicação de um vetor pela matriz $(\mathbf{I}-\mathbf{X}\mathbf{X}^+)$ fornecerá como resultado um vetor que será ortogonal à matriz \mathbf{X} [55]. Dessa forma, a matriz $\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}$ é obtida pela Equação 11 [56].

$$\hat{\mathbf{X}}_{A,-k} = (\mathbf{I} - \hat{\mathbf{y}}_{A,k} \hat{\mathbf{y}}_{A,k}^+) \hat{\mathbf{X}}_A \quad (11)$$

em que, $\hat{\mathbf{y}}_{A,k}$ é o vetor de concentrações da espécie de interesse k estimado com A variáveis latentes segundo a Equação 12 [56].

$$\hat{\mathbf{y}}_{A,k} = \hat{\mathbf{X}}_A \hat{\mathbf{X}}_A^+ \mathbf{y}_k \quad (12)$$

Assim, a matriz $\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}$ fica livre de qualquer contribuição da espécie k , uma vez que a projeção realizada na equação indica a parte da matriz \mathbf{X} que é ortogonal ao vetor \mathbf{y} que contém os valores do método de referência e, portanto, a matriz $\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}$ contém uma parte de \mathbf{X} que não possui relação com \mathbf{y} . O vetor NAS pode, então, ser obtido com uma nova

3. Revisão Bibliográfica

projeção que indicará a parte da matriz \mathbf{X} que é ortogonal à matriz de interferentes $\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}$, resultando assim na parte de \mathbf{X} que não possui relação com os interferentes (Equação 13):

$$\hat{\mathbf{x}}_{A,k}^{nas} = (\mathbf{I} - \hat{\mathbf{X}}_{A,k}^T (\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}^T)^+) \hat{\mathbf{x}}_A \quad (13)$$

Em que $\hat{\mathbf{x}}_A$ é o vetor de resposta instrumental de uma amostra estimado com A variáveis latentes. Uma vez que $\mathbf{x}_{A,k}^{nas}$ é livre de interferentes, é possível substituí-lo por uma representação escalar, sem perda de informação. Assim, a representação escalar do vetor NAS é dada pela Equação 14.

$$\mathbf{nas}_i = || \hat{\mathbf{x}}_{A,k}^{nas} || \quad (14)$$

Em que $||$ representa a norma Euclidiana do vetor $\mathbf{x}_{A,k}^{nas}$.

Com a possibilidade de calcular um valor escalar livre de interferentes, a partir de um vetor contendo contribuições de constituintes desconhecidos, é possível construir uma nova forma de calibração multivariada, em que o modelo pode ser representado em uma forma pseudo-univariada.

A representação univariada de um modelo de calibração multivariada possibilita avaliar a porção do sinal que eficientemente participa do modelo [57].

De posse do cálculo do NAS para as i amostras de calibração, o coeficiente de regressão pode ser determinado, por mínimos quadrados, entre o vetor \mathbf{nas} e o vetor de concentrações \mathbf{y} (Equação 15).

$$\hat{\mathbf{b}}_{nas} = (\mathbf{nas}^T \mathbf{nas})^{-1} \mathbf{nas}^T \mathbf{y} \quad (15)$$

O modelo de regressão pode ser então, representado pela Equação 16.

$$\hat{\mathbf{y}} = \hat{\mathbf{b}}_{nas} \mathbf{nas} + \epsilon \quad (16)$$

Em que os resultados obtidos por meio das equações 1e16 são equivalentes.

Quando os dados são centrados na média para a construção do modelo de calibração multivariada, o vetor **nas** precisa ser corrigido para evitar um erro de sinal que é introduzido pelo uso da norma Euclidiana, antes da determinação do coeficiente de regressão \hat{b}_{nas} . Esta correção pode ser feita multiplicando cada elemento do vetor **nas** pelo seu sinal correspondente no vetor $(\mathbf{y} - \bar{\mathbf{y}})$, onde $\bar{\mathbf{y}}$ é a média do vetor **y** que contém os valores de referência [58].

3.4.2 Figuras de Mérito

As figuras de mérito descritas a seguir estão de acordo com normas específicas e trabalhos científicos divulgados por meio de periódicos. Para este trabalho, as figuras de mérito foram estimadas segundo a norma ASTM E1655-05, IUPAC e cálculos apresentados em trabalhos científicos com o intuito de validar os modelos PLS construídos a partir de espectros obtidos na região do MIR, para determinações de parâmetros de controle de qualidade biodiesel.

3.4.2.1 Exatidão

Expressa o grau de concordância entre o valor estimado ou medido e o valor tido como verdadeiro ou de referência. Comumente em aplicações com calibração multivariada, a exatidão é estimada através do RMSEC (Erro Quadrático Médio de Calibração) e RMSEP (Erro Quadrático Médio de Previsão), calculado de acordo com a Equação 17 [47].

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\mathbf{y}_i - \hat{\mathbf{y}}_i)^2}{N}} \quad (17)$$

Em que N é o número de amostras, \mathbf{y}_i o vetor referência que contém a concentração do analito de interesse e $\hat{\mathbf{y}}_i$ é o vetor que contém os valores previstos da concentração dada pelo modelo. Contudo, cabe ressaltar que o RMSEP expressa apenas a exatidão média do modelo, não podendo ser usado somente este parâmetro para avaliar a exatidão do modelo, por não ser capaz de avaliar a presença de erro sistemático.

Além disso, a exatidão pode ser avaliada também pela média do erro relativo (EM) expressa de acordo com a equação 18.

$$EM = \frac{(\gamma_{prev} - \gamma_{real}) \times 100}{\gamma_{real}} \quad (18)$$

3.4.2.2 Ajuste do modelo

O grau de ajuste do modelo pode ser estimado a partir da correlação entre os valores de referência e os valores estimados da propriedade de interesse pelo modelo para as amostras de calibração. Isso é feito determinando-se, por mínimos quadrados, a reta que melhor se ajusta aos valores de referência e os estimados pelo modelo. Uma vez que o escalar NAS é determinado, o ajuste do modelo também pode ser determinado através da melhor reta que se ajusta ao gráfico do NAS contra a concentração, para as amostras de calibração [47, 59].

3.4.2.3 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de um determinado intervalo de concentrações onde o método será aplicado. Qualitativamente, a distribuição aleatória do gráfico de resíduos para as amostras de calibração e validação é um indicativo da linearidade do modelo construído que podem indicar se os dados seguem ou não um comportamento linear [47].

3.4.2.4 Sensibilidade

É definida como a fração do sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração da propriedade de interesse. Para modelos de calibração multivariada, como PLS, pode ser determinada pela Equação 19 relacionada abaixo.

$$S\hat{E}N = \frac{1}{\|\mathbf{b}_k\|} \quad (19)$$

em que \mathbf{b}_k é o vetor dos coeficientes de regressão estimados pelo PLS.

3.4.2.5 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica, γ , não é abordada em normas ou guias de validação. No entanto, esse parâmetro apresenta a sensibilidade do método em termos da unidade de concentração que é utilizada, sendo definida como a razão entre a sensibilidade e o desvio padrão do sinal de referência (δx).

$$\gamma = \frac{S\hat{E}N}{\|\delta x\|} \quad (20)$$

em que $S\hat{E}N$ é obtido através das equações (19) e (20) acima e δx é o desvio padrão do sinal de referência estimado através do desvio padrão do valor de NAS para os espectros do sinal de referência [60].

O inverso desse parâmetro, ou seja, γ^{-1} , permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras, que pode ser distinguida pelo método.

3.4.2.6 Seletividade

É a medida do grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes presentes na amostra, indicando também, a parte do sinal que é perdida por essa sobreposição. Para modelos de calibração multivariada, a seletividade, $S\hat{E}L_{k,i}$ é definida na Equação 21.

$$S\hat{E}L_{k,i} = \frac{n\hat{a}s_{k,i}}{\|x_{k,i}\|} \quad (21)$$

em que, $n\hat{a}s_{k,i}$ é o valor escalar do sinal analítico líquido para a amostra i e $\mathbf{x}_{k,i}$ representa o vetor de respostas instrumental para a amostra i [55].

3.4.2.7 Razão sinal/ruído

É definida pela razão do sinal do analito em questão e o sinal do ruído instrumental, que é estimado pela flutuação do sinal do branco. De acordo com o NAS, indica o quanto da intensidade do NAS do analito está acima do desvio padrão do sinal de referência [55].

$$S / N_{k,i} = (\hat{n}_{k,i}) / \delta x \quad (22)$$

Em que, $\hat{n}_{k,i}$ é o valor escalar do sinal analítico líquido para a amostra i e δx é o desvio padrão do sinal do branco (espectro sem o analito em questão).

3.4.2.8 Teste para erro sistemático

De acordo com a definição da IUPAC, “bias” é definido como a diferença entre a média da população e o valor verdadeiro. A existência desse tipo de erro afeta a precisão, exatidão e a determinação dos intervalos de confiança. A norma ASTM E1655-05 aborda a investigação de erros sistemáticos em modelos de calibração multivariada através do teste t-student, para as amostras de validação no nível de 95% de confiança para avaliar quantitativamente se o “bias” presente no modelo é significativo. Para este teste, primeiro é calculado a média do “bias” para o conjunto de validação usando a Equação 23.

$$bias = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)}{n} \quad (23)$$

em que, n corresponde ao número de amostras do conjunto de validação. A seguir, o desvio padrão dos erros de validação (SDV) é obtido por:

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum [(y_i - \hat{y}_i) - bias]^2}{n-1}} \quad (24)$$

Por fim, o valor de t é dado por:

$$t_{bias} = \frac{|bias|\sqrt{n}}{SDV} \quad (25)$$

Caso o valor de t_{bias} apresentar resultado maior do que o valor de $t_{crítico}$ para n graus de liberdade, onde n é o número de amostras da validação, com 95% de confiança, isso é uma evidência de que erros sistemáticos presentes no modelo multivariado são significativos. No entanto, se o valor de t_{bias} calculado apresentar valor menor do que o valor crítico, então, o erro sistemático incluído no modelo pode ser considerado insignificante e desprezado [61].

3.4.2.9 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico, expressa as menores quantidades da espécie de interesse que podem ser detectadas e determinadas de forma quantitativa, respectivamente. Para um conjunto de dados que apresenta comportamento no qual a variância é constante ao longo da faixa de trabalho, erro com previsão não correlacionado e que segue uma distribuição normal, os LD e LQ na calibração multivariada podem ser calculados por:

$$LD = 3,3\delta_x \|b_k\| \quad \text{ou} \quad 3,3\delta_x \frac{1}{SEN} \quad (26)$$

$$LQ = 10\delta_x \|b_k\| \quad \text{ou} \quad 10\delta_x \frac{1}{SEN} \quad (27)$$

em que δ_x é o desvio padrão do sinal de referência b_k é o vetor dos coeficientes de regressão do modelo PLS para a espécie k , SEN corresponde ao valor de sensibilidade obtido através das equações 26 e 27 [62].

3.4.2.10 Intervalo de Confiança

Os intervalos de confiança (IC) para um valor estimado por um modelo multivariado é dado pela Equação 28.

$$IC = t \cdot SEC \cdot \sqrt{1 + h} \quad (28)$$

Onde SEC (erro padrão de calibração) é calculado pela Equação 29.

$$SEC = \sqrt{\frac{e^t e}{d}} \quad (29)$$

Em que:

$e = \hat{y}_i - y_i$ e d é o número de graus de liberdade do modelo de calibração calculado por $n-k-1$ para dados centrados na média, e n é o número de amostras de calibração e k o número de variáveis latentes, t é o valor de t-student e h é o leverage.

Os intervalos de confiança para as amostras de previsão devem ser calculados e uma determinação deve ser feita para avaliar se os valores de referência individuais estão dentro da faixa entre $\hat{y}_i \pm IC$.

Poucos trabalhos de validação de calibração de primeira ordem foram desenvolvidos. Sena e colaboradores usaram uma combinação de PLS e espectrofotometria no UV-Visível para quantificar paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas e validaram sua metodologia através de algumas figuras de mérito tais como sensibilidade, limite de detecção e quantificação, precisão média. Obtiveram bons resultados mostrando a eficiência da técnica para o controle de fármacos e atestando a eficiência do modelo. Rodriguez-Cuesta e colaboradores desenvolveram e validaram um método na determinação de pesticidas em águas subterrâneas a partir da HPLC e Correção Multiplicativa de Sinais (MCR).

Valderrama, Braga e Poppi avaliaram a aplicação das figuras de mérito e concluíram que em dados de primeira ordem, embora complexos, são bem desenvolvidas. Mas em dados de segunda ordem, as pesquisas ainda se encontram em desenvolvimento [13].

Olivieri e seus colaboradores avaliaram o desenvolvimento da validação de calibração multivariada de primeira ordem e segunda ordem e chegaram a conclusão que métodos multivariados podem extrair informações verdadeiramente quantitativas de dados altamente seletivos [54].

Rocha, Nogueira e Vaz determinaram teor de biodiesel em misturas de biodiesel/diesel na faixa de concentração de 2-90% por espectroscopia no infravermelho próximo. O método utilizado foi o PLS e a validação do método foi feita através do cálculo de figuras

3. Revisão Bibliográfica

de mérito. Os melhores resultados foram obtidos ao usarem Correção Multiplicativa de Sinal como pré-tratamento [63].

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4. Procedimento Experimental

4.1 Parte Experimental

4.1.1 Obtenção do diesel e biodiesel

O diesel puro utilizado no preparo de amostras foi cedido pela TRANSPETRO S/A localizada em Uberlândia, estado de Minas Gerais, Brasil. O óleo refinado de soja, usado na síntese do biodiesel, foi adquirido no comércio local. Os biodieseis foram produzidos pela reação de transesterificação de óleo soja com os álcoois metílico e etílico na razão de massa 5:1 óleo/álcool na presença de 1% (m/m) de catalisador. O tempo de reação para as rotas metílica e etílica foi o mesmo, aproximadamente 80 minutos. Após o tempo de reação, a fase glicerol foi removida e o biodiesel lavado com água quente (aproximadamente 80 °C) para a retirada das impurezas. A etapa de secagem do biodiesel foi realizada empregando evaporador rotativo por 1 hora a 80rpm e 80 °C.

Para a produção de biodiesel metílico ou etílico de soja, foram pesados 100,00 g do óleo o qual é misturado a uma solução formada por 30,00 g de álcool metílico ou etílico e 1% (m/m) de KOH em relação ao óleo. A mistura foi colocada em um agitador magnético durante 1 h a temperatura ambiente como mostrado na Figura 11.



Figura 11. Processo de reação de transesterificação

Para todos os biodieseis sintetizados via rota etílica, o excesso de álcool deve ser retirado da mistura através do evaporador rotatório (Figura 12), com 90 rpm e temperatura de aproximadamente 80°C.

4. Procedimento Experimental



Figura 12. Processo de retirada do excesso de álcool na produção do biodiesel etílico.

Após o período de reação, a mistura foi transferida para um funil de decantação para a separação das fases biodiesel (superior) e glicerol (inferior) conforme a Figura 13e deixada em repouso por 24 h.



Figura13. Separação das fases: biodiesel e glicerol.

Após separar o glicerol do biodiesel iniciou-se o processo de sucessivas lavagens com água destilada, a aproximadamente 80°C para a retirada das impurezas conforme mostrado na Figura 14.

4. Procedimento Experimental



Figura 14. Processo de purificação do biodiesel

Em seguida, secou-se a água no evaporador rotatório à temperatura de 80°C e rotação de 88 rpm (aproximadamente), por um período de 40 minutos, obtendo o biodiesel puro (Figura 15).

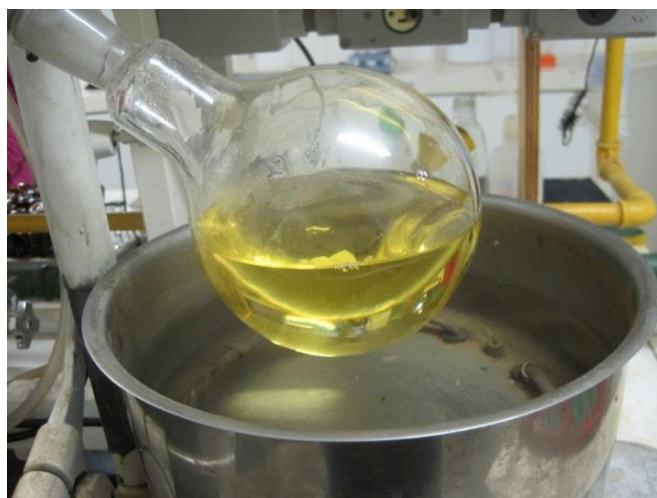


Figura 15. Processo de Secagem do Biodiesel

4.1.2 Obtenção dos espectros

Para a obtenção dos espectros MIR-HATR, as amostras B5 foram preparadas pela adição de 5 g de biodiesel em 95 g de diesel, em cada mistura utilizada na construção dos modelos PLS. As pesagens foram realizadas em uma balança analítica (Sartorius, modelo BP211D). A solução de B5 foi homogeneizada em agitador Vortex. Em seguida, adicionou-se o adulterante (óleo de soja ou residual) na faixa de concentração de 1,00 a

4. Procedimento Experimental

30,00% (m/m). As amostras utilizadas para calibração e previsão dos modelos foram preparadas de forma independente de maneira que as concentrações de previsão fossem diferentes das concentrações de calibração. Aos biodieseis puros (B100) adicionou-se álcool na faixa de concentração de 0,14% a 1,00% (m/m), seguindo a mesma preparação descrita acima.

Os espectros foram obtidos em triplicata, na região de 4.000 a 600 cm^{-1} , no equipamento PerkinElmer – Spectrum Two, utilizando o Acessório Horizontal de Refletância Total Atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe), resolução de 4 cm^{-1} e 16 varreduras. A correção dos espectros foi realizada por baseline.

Foram construídos quatro modelos PLS para quantificação de óleo vegetal em misturas biodiesel/diesel B5: a) biodiesel etílico de soja misturado ao diesel (BES 5); b) biodiesel metílico de soja misturado ao diesel (BMS 5); c) biodiesel etílico de óleo residual misturado ao diesel (BER 5) e d) biodiesel metílico de óleo residual misturado ao diesel (BMR 5). A Figura 16 mostra os espectros de todos os modelos PLS B5.

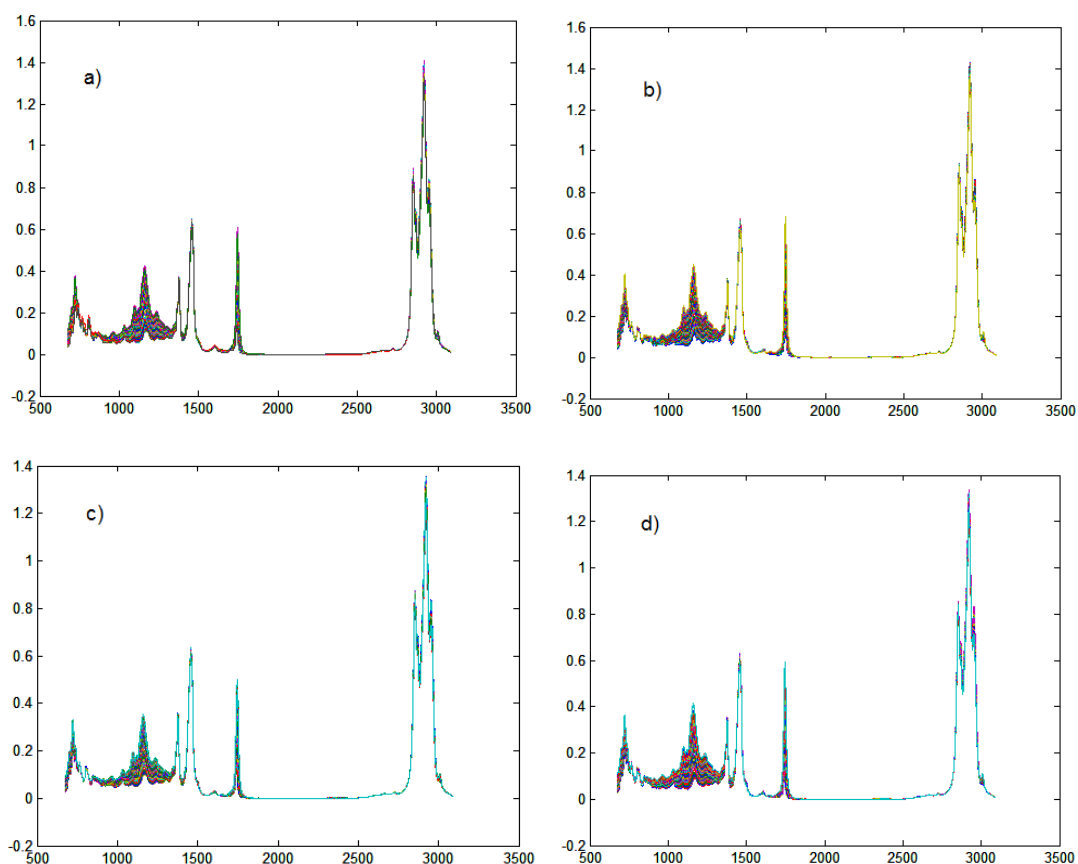


Figura 16. Espectros de misturas de biodiesel em diesel. a) BES 5, b) BMS5, c) BER5 e d) BMR5.

4. Procedimento Experimental

E, para a quantificação de álcool em biodieseis puros (B100) foram construídos também quatro modelos PLS: a) biodiesel etílico de soja (BES 100); b) biodiesel metílico de soja (BMS 100); c) biodiesel etílico de óleo residual (BER 100) e d) biodiesel metílico de óleo residual (BMR 100). A Figura 17 mostra os espectros de todos os modelos PLS B100.

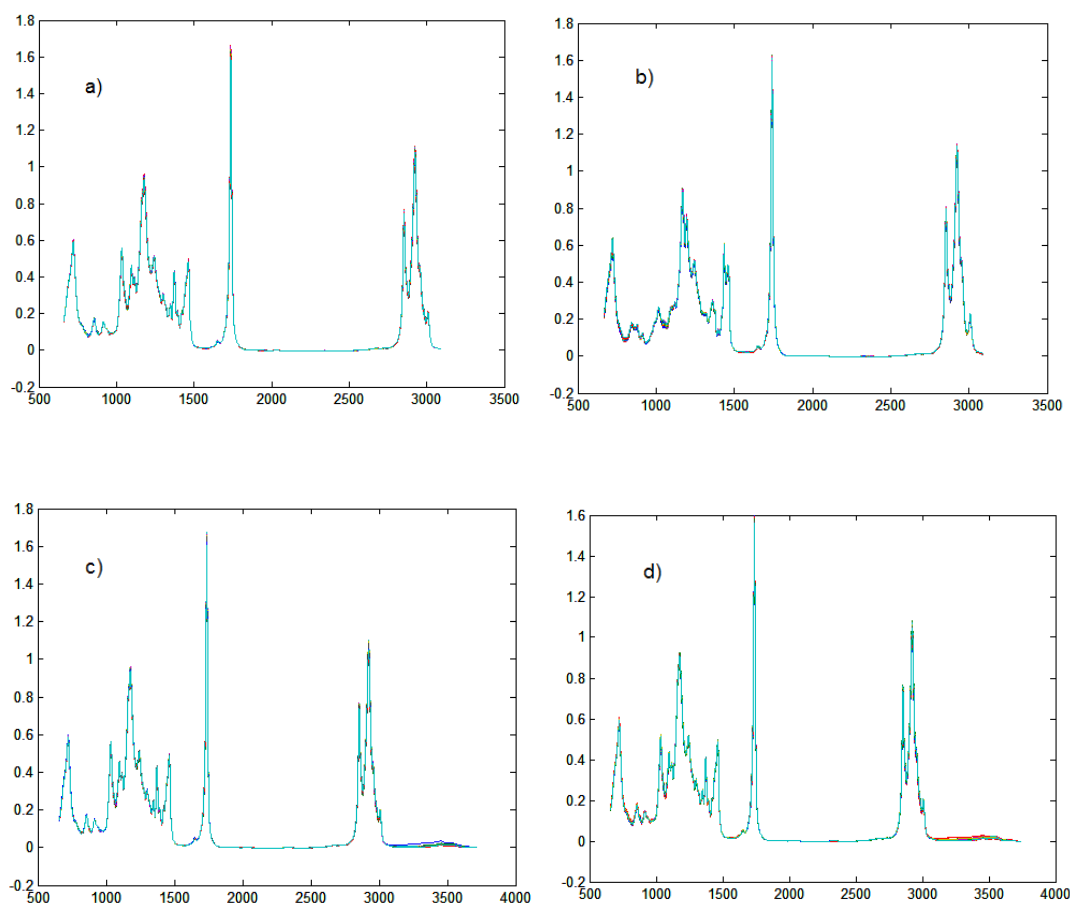


Figura 17. Espectros dos biodieseis puros. a) BES 100, b) BMS100, c) BER100 e d) BMR100.

4.1.3 Construção dos modelos PLS

Os programas utilizados para a construção dos modelos foram Matlab 6.1 (MathWorks Inc.) e PLS Toolbox 3.5 (Eigenvector Research). Para a construção dos modelos os dados foram centrados na média e o valor de RMSECV foi obtido pelo método de validação cruzada “leave-one-out”. O número de variáveis latentes foi escolhido

4. Procedimento Experimental

conforme a porcentagem de variância explicada nos blocos **X** (absorvâncias) e **y** (concentração) em comparação conjunta com o gráfico do RMSECV.

As amostras anômalas foram eliminadas conforme valor de leverage nos dados espectrais, valor do que não foi modelado nos dados espectrais e nos resíduos pelo PLS, no nível de confiança de 95%. Amostras com altos valores de leverage e altos resíduos foram consideradas anômalas.

Para a validação dos modelos PLS determinaram-se várias figuras de mérito. A exatidão dos modelos foi determinada através do cálculo de RMSECV, RMSEP, RMSEC e a EM.

A linearidade foi avaliada através de dois parâmetros, o gráfico de ajuste e resíduos. O ajuste dos modelos PLS foi avaliado através da correlação entre: a) os valores reais versus valores previstos no modelo; e b) da norma do NAS versus concentração, uma vez que o NAS é diretamente proporcional à mesma.

Já o gráfico de resíduos para as amostras de calibração e previsão mostra os erros absolutos para cada amostra. Nele é possível detectar se há problemas no ajuste da curva através da distribuição dos resíduos. Se as amostras estão distribuídas de forma aleatória pode-se dizer que o modelo é linear.

A existência de erros sistemáticos foi determinada através do teste estatístico t-Student, como descrito na norma ASTM E1655-05 em que se o valor de t calculado (t_{bia}) for menor que o valor de $t_{crítico}$ então o modelo não possui erro sistemático significativo.

A sensibilidade foi calculada através do vetor do coeficiente de regressão estimado pelo modelo PLS de acordo com a Equação 19 e a sensibilidade analítica através da Equação 20. Encontrado os valores de sensibilidade e sensibilidade analítica é possível calcular o inverso da sensibilidade em que o valor encontrado significa o quanto de concentração o modelo pode distinguir entre uma amostra e outra.

A seletividade foi calculada através do vetor NAS pelo vetor do analito de acordo com a Equação 21 que indicam o quanto o método separa o sinal do analito dos interferentes.

A razão sinal-ruído também pode ser calculada pelo vetor NAS em relação ao desvio padrão observando a Equação 22. Quanto maior os valores da razão sinal- ruído mais eficaz é o modelo no que se refere a discernir o que é ruído e o que é o sinal das amostras do sinal instrumental.

4. Procedimento Experimental

Os limites de detecção e quantificação podem ser calculados de forma análoga à calibração univariada de acordo com as Equações 26 e 27. Eles indicam a menor concentração detectada e quantificada pelo método, respectivamente.

Os intervalos de confiança foram calculados de acordo com as Equações 28 e 29. Se mais que 5% dos valores de referência cair fora da faixa, então o limite de confiança baseado no SEC é questionável.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados e Discussão

5.1.1 Modelos PLS B5

Quando se emprega espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada é necessário seguir algumas recomendações da norma ASTM E1655-05. Esta estabelece que o número mínimo de amostras no conjunto de calibração seja igual a $6(k+1)$ para os dados centrados na média. E, $4k$ para o conjunto de previsão onde k refere-se ao número de variáveis latentes escolhidas no modelo. Caso o número de variáveis latentes seja menor ou igual a 3, o mínimo de amostras no conjunto de calibração é de 24 depois da eliminação de amostras anômalas. Para o conjunto de previsão se k for menor que 5, o mínimo de amostras no conjunto é de 20, depois da eliminação das amostras anômalas [61].

O número ideal de VL é aquele que permite a criação de um modelo com menor erro de previsão sem perda significativa da variância dos dados. O n° de VL foi escolhido conforme a porcentagem de variância explicada nos blocos **X** (absorvâncias) e **Y** (concentração) mostrados na Tabela 2 em comparação conjunta com o gráfico de RMSECV conforme demonstrado na Figura 18. A validação cruzada é realizada pelo método “leave-one-out” em que uma amostra é retirada do conjunto de calibração e a concentração daquela amostra é prevista construindo o modelo. Então, calcula-se o erro de previsão daquela amostra e esse procedimento é repetido até que todas as amostras sejam retiradas uma vez do modelo. O comportamento observado nesses gráficos em comparação com os valores de variância explicada indica a melhor dimensionalidade do modelo de regressão, ou seja, o menor número de variáveis latentes que produziu um baixo erro de validação cruzada. Caso o número de variáveis latentes escolhido seja menor que o ideal, há uma falta de ajuste no modelo e se o número de variáveis latentes for maior que o ideal há um sobreajuste indicando um modelo com baixa robustez (capacidade de se ajustar a pequenas modificações do modelo) [63]. Para o modelo BES5 foram empregadas 4 VL. Isso ocorre porque esse número apresenta um baixo valor de RMSECV e explica 99,88% de variância em **X** e 99,96% em **y**. Comportamento semelhante pode ser verificado para os demais modelos B5.

5. Resultados e Discussão

Tabela 2. Número de amostras no conjunto de calibração e previsão para os modelos B5

| MODELO | BES 5 | BMS 5 | BER 5 | BMR 5 |
|---------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| Adulterante | Óleo vegetal | Óleo vegetal | Óleo residual | Óleo residual |
| Nº amostras de cal | 39 | 47 | 40 | 38 |
| Nº amostras de prev | 25 | 31 | 23 | 24 |
| VL | 4 | 4 | 4 | 5 |
| RMSECV % (m/m) | 0,31 | 0,36 | 0,27 | 0,02 |
| Variância em X % | 99,88 | 99,97 | 99,91 | 99,94 |
| Variância em Y % | 99,96 | 99,99 | 99,97 | 99,98 |

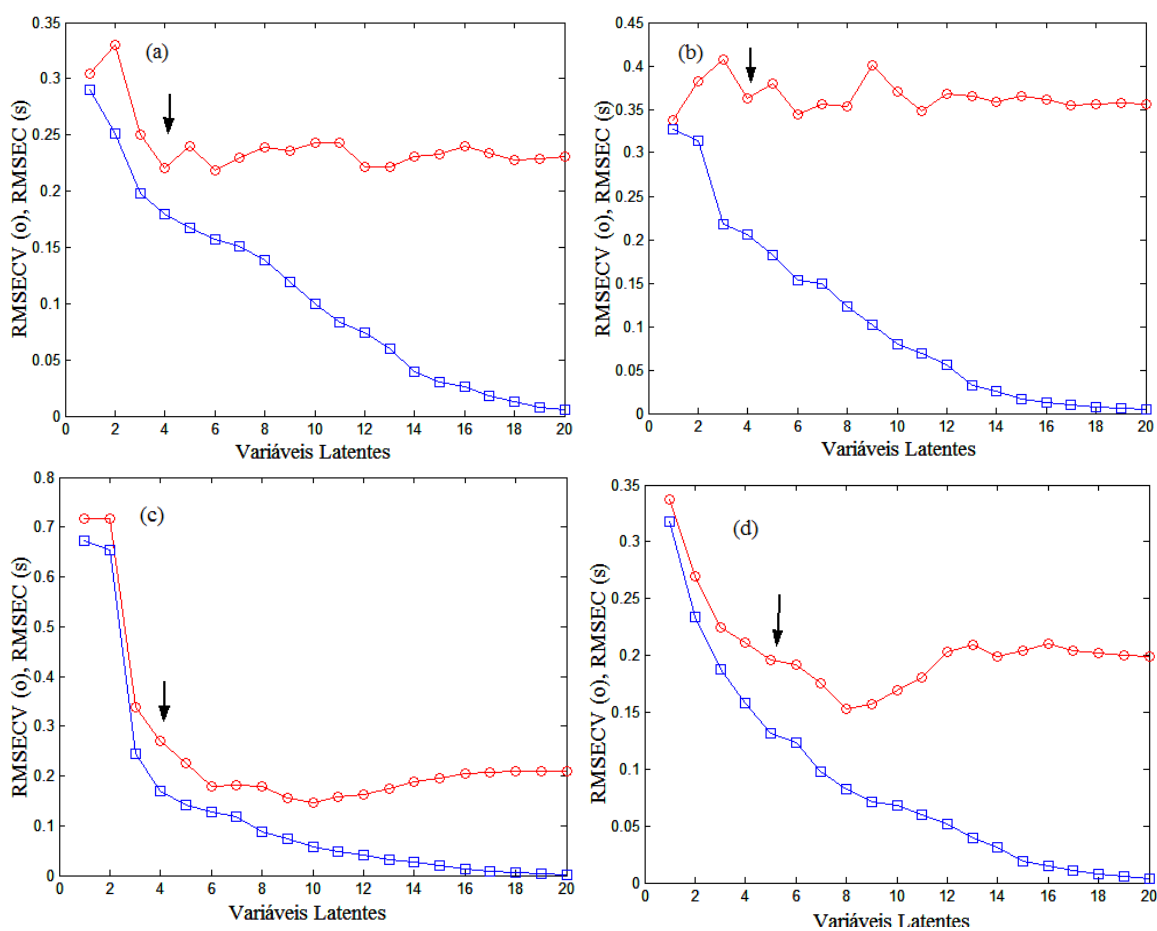


Figura 18. Gráfico de RMSECV para os modelos (a) BES5, (b) BMS5, (c) BER5 e (d) BMR5.

L

5. Resultados e Discussão

O número de amostras usadas no conjunto de calibração e previsão está de acordo com as recomendações da norma ASTM E1655-05. Isso só é verificado após a retirada das amostras anômalas. Por exemplo, para o modelo BES5, 4 VL, o mínimo de amostras no conjunto de calibração deve ser 30 e para o conjunto de previsão 20, pois esse é o mínimo permitido já que o número de VL foi menor que 5. Observando a Tabela 2, verifica-se que tanto no conjunto calibração quanto no de previsão o número de amostras de todos os modelos estão concordantes com a norma ASTM E1655-05.

A Tabela 3 mostra os valores de RMSEC, RMSEP e R na presença e na ausência das amostras citadas como anômalas. Observa-se que para o modelo BES5, uma vez retirada a amostra 41, todos os resultados melhoraram. Para o modelo BER5, ao retirar a amostra oito, o RMSEC aumentou, porém, o RMSEP teve uma diminuição significativa e o aumento no valor de R indica que há uma melhor correlação entre os valores reais e previstos. Após a retirada das amostras anômalas, efetuou-se então a construção dos modelos PLS empregando a validação cruzada.

Tabela 3. Valores de RMSECV, RMSEC, RMSEP e R para os modelos BES5 e BER5 com e sem amostras anômalas.

| | BES 5 | BES 5 | BER5 | BER 5 |
|---------------|------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Com amostra anômala | Sem amostra anômala | Com amostra anômala | Sem amostra anômala |
| RMSECV% (m/m) | 0,31 | 0,22 | 0,20 | 0,27 |
| RMSEC % (m/m) | 0,19 | 0,18 | 0,16 | 0,17 |
| RMSEP % (m/m) | 0,27 | 0,22 | 0,50 | 0,23 |
| R | 0,9995 | 0,9997 | 0,9987 | 0,9996 |

Para avaliar se os modelos desenvolvidos são capazes de prever corretamente os valores das amostras, ou seja, para verificar a eficiência dos modelos, foram analisadas as seguintes figuras de mérito: exatidão, linearidade, sensibilidade, sensibilidade analítica, seletividade, razão sinal/ruído, bias, limite de detecção e limite de quantificação.

A exatidão é determinada pelos parâmetros RMSECV, RMSEC, RMSEP e EM. Um bom modelo implica em baixos valores de erros. Os valores de RMSEC, além de menores,

5. Resultados e Discussão

devem possuir uma pequena diferença em relação ao RMSEP, pois, os modelos não podem prever melhor que a calibração. Dessa forma, os modelos apresentaram boa exatidão comparada à literatura [22, 61, 64]. Conforme Tabela 4, os baixos valores de erros indicam que os valores estimados pelo modelo PLS apresentam uma boa concordância com os valores de referência.

Tabela 4. Parâmetros de exatidão dos modelos B5 construídos.

| MODELO | BES 5 | BMS 5 | BER 5 | BMR 5 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| RMSEC % (m/m) | 0,18 | 0,21 | 0,17 | 0,13 |
| RMSECV% (m/m) | 0,22 | 0,36 | 0,20 | 0,02 |
| RMSEP% (m/m) | 0,22 | 0,26 | 0,23 | 0,16 |
| EM % | 1,12 | 1,42 | 1,83 | 1,24 |

A linearidade é a capacidade de um método analítico obter resultados proporcionais à concentração da espécie em análise em que é possível relacionar uma medida através do conhecimento de uma dada concentração. A linearidade é avaliada por dois parâmetros, ajuste e gráfico de resíduos.

O ajuste dos modelos foi verificado com base nos gráficos dos valores reais versus previstos. Conforme mostrado na Figura 20, as amostras de calibração (círculos azuis) e de previsão (asteriscos vermelhos) estão próximas à regressão e bem distribuídas ao longo da reta. De acordo com os valores dos coeficientes angulares, linear e de correlação, observa-se que o ajuste para o modelo PLS tem uma boa correlação entre os dados de referência e os dados calculados pelo modelo uma vez que quanto mais próximo de 1 para a inclinação, e mais próximo de 0 para o intercepto, melhor é a concordância entre os valores. O coeficiente de regressão indica o quanto a reta pode ser adequada como modelo matemático. De acordo com a ANVISA, o critério mínimo aceitável é $R = 0,99$. Os modelos apresentaram boa linearidade com valores de R acima de 0,999 [65].

Na Figura 18, também pode observar que as amostras de previsão estão dentro da faixa de concentração para os quais os modelos foram desenvolvidos; isto é, não houve uma extrapolação dos modelos [61].

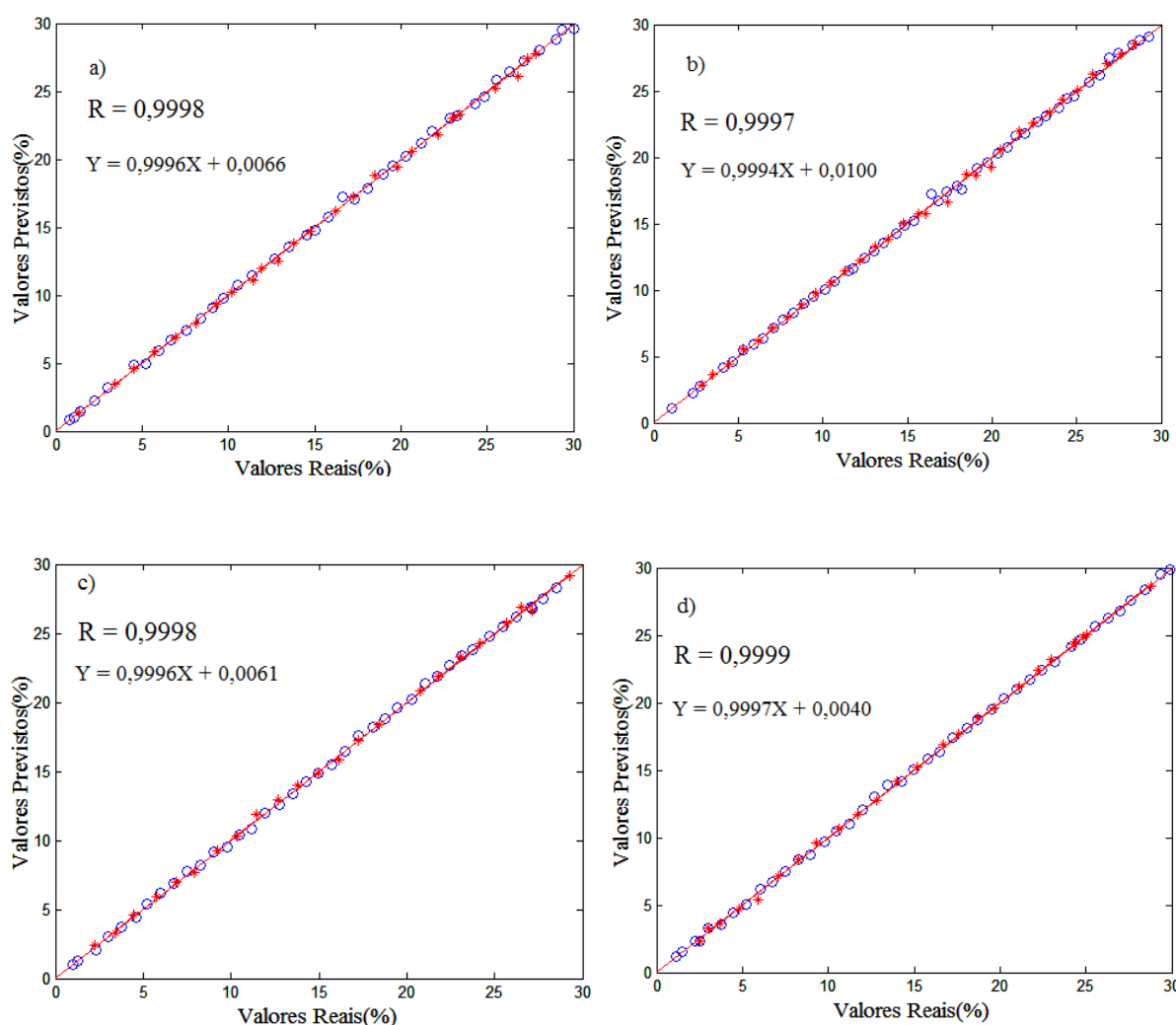


Figura 20. Ajuste para as amostras de B5 adulteradas com óleo: (a) BES5 (b) BMS5 (c) BER5 (d) BMR5

Outra forma de avaliar o ajuste é através do gráfico de valores escalares do NAS, determinada pela norma do vetor do sinal analítico líquido em função da concentração da espécie de interesse, uma vez que, como dito anteriormente, ambos são diretamente proporcionais. A Figura 21 mostra os gráficos para os modelos B5, em que o ajuste pelo NAS demonstrou uma boa linearidade, conforme indicado pelo R acima de 0,999.

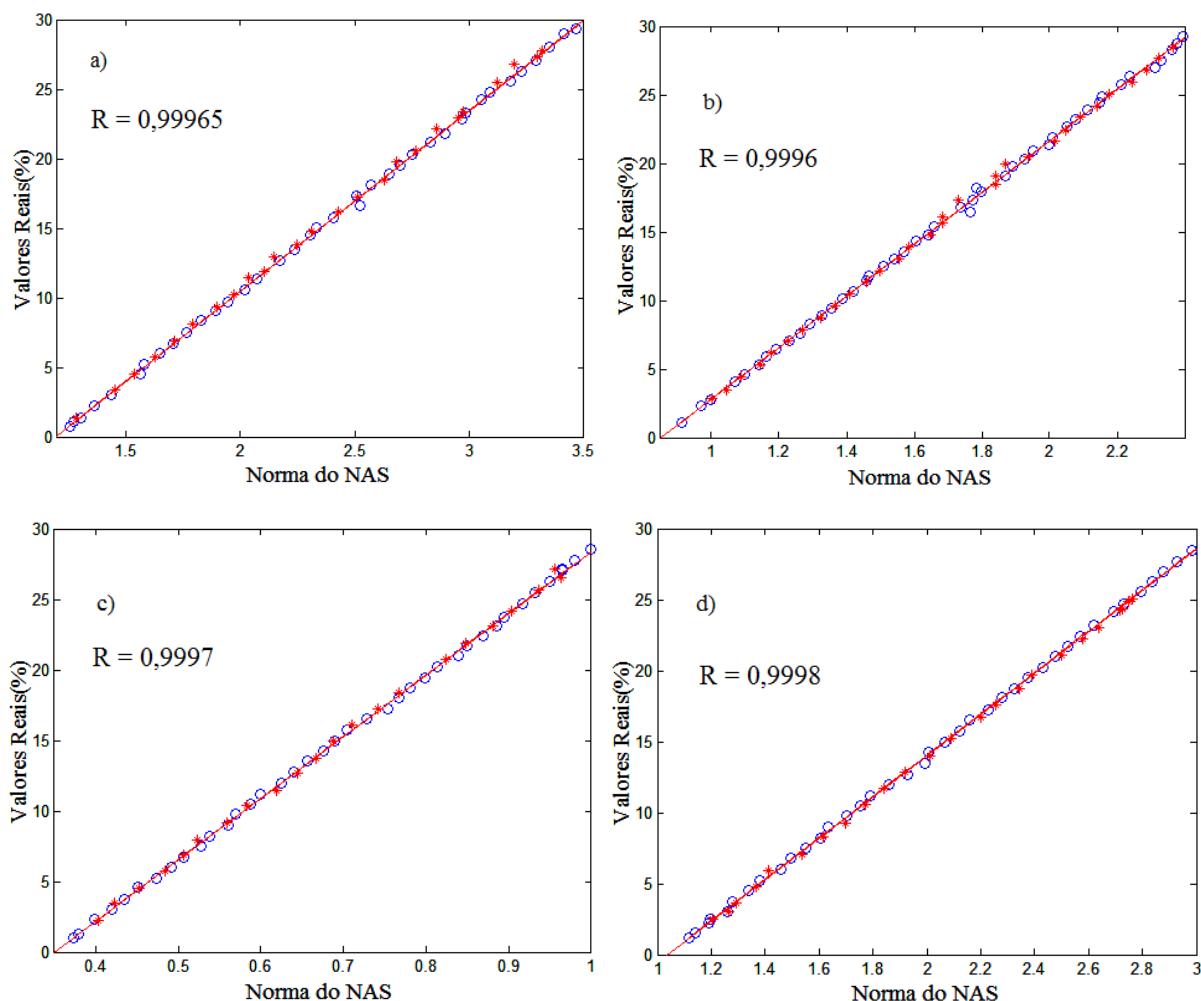


Figura 21. Norma do NAS versus valores de referência das concentrações para as amostras de calibração e validação: (a) BES5 (b) BMS5 (c) BER5 e (d) BMR5.

A linearidade de modelos de calibração multivariados pode ser avaliada também por meio do gráfico de erros. Através da análise deste gráfico é possível detectar problemas no ajuste da curva (linearidade, presença de amostras atípica, heterocedasticidade e dependência entre os erros). Uma curva bem ajustada com comportamento linear apresenta erro com distribuição uniforme e aleatória. Tal comportamento foi apresentado pelos modelos B5 conforme a Figura 22. Além disso, é possível verificar que os maiores valores de erros absolutos para os modelos PLS B5 foram de 0,8% (m/m) que corresponde a um erro relativo abaixo de 4,8%.

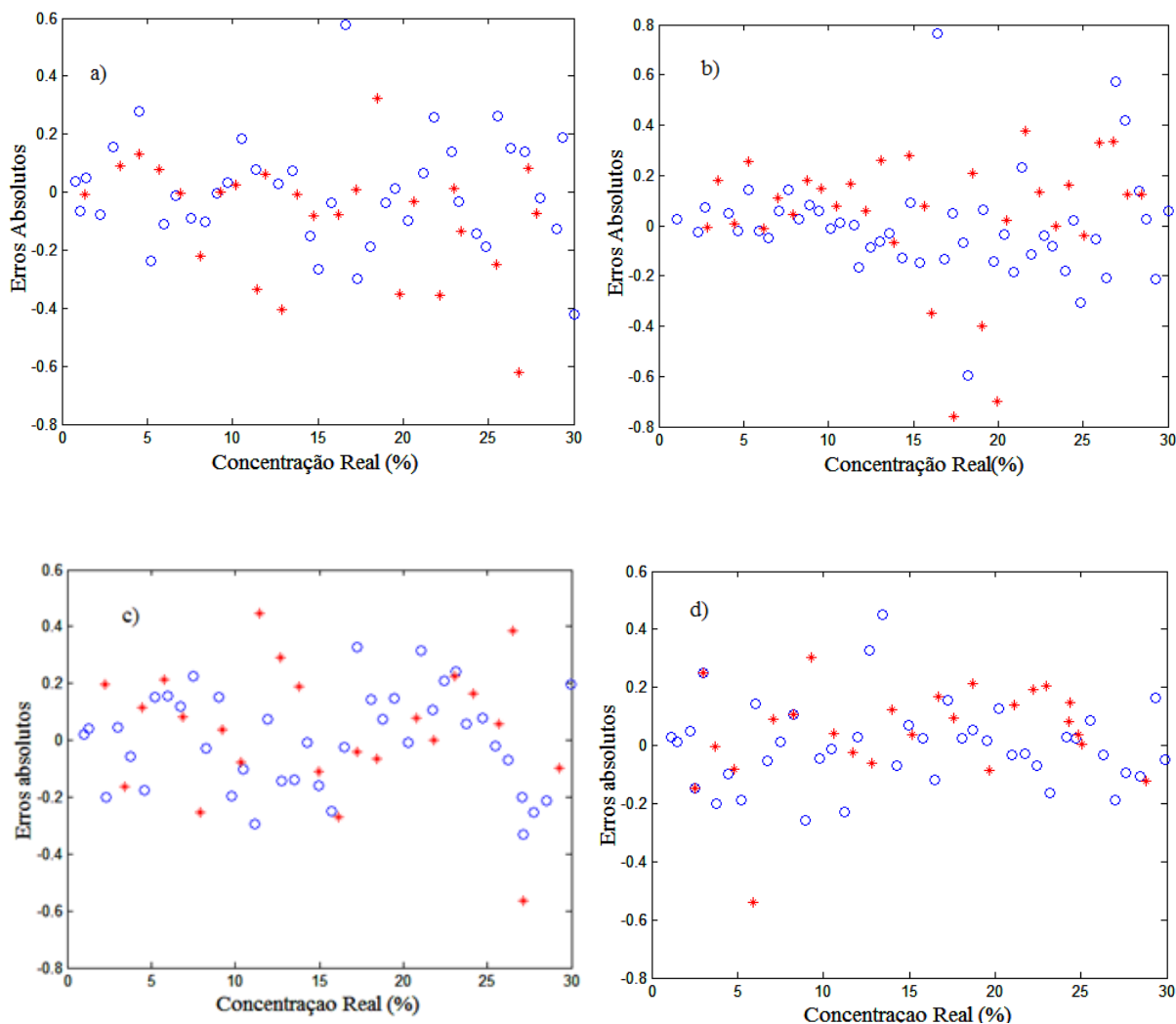


Figura 22. Gráfico de erros para as amostras B5 adulteradas com óleo. BES5(a), BMS5(b), BER5(c) e BMR5(d).

A ausência de erro sistemático nas amostras de previsão foi verificada através de um teste t-Student com graus de liberdade igual ao número de amostras do conjunto de previsão e nível de confiança de 95%. Comparando o t_{bias} com o $t_{crítico}$, apresentado na Tabela 5, verifica-se que os valores de $t_{crítico}$ estão acima dos valores de t_{bias} . Isso indica que os erros sistemáticos presentes no modelo não são estatisticamente significantes, ou seja, são desprezíveis. Dessa forma, foi constatada a ausência de tendência sistemática nos resultados.

A sensibilidade indica a fração do sinal analítico responsável pelo aumento em uma unidade de concentração de um analito. A sensibilidade analítica pode ser interpretada de forma mais clara, por sua relação direta com a concentração. É então calculada pela razão de sensibilidade com a norma do desvio padrão do branco. O inverso desse parâmetro,

5. Resultados e Discussão

apresentado na Tabela 5, indica a diferença de concentração que o modelo consegue distinguir entre uma amostra e outra. Então, para o modelo BES5 é possível fazer a distinção de amostras com diferença de concentração 0,08% (m/m) de óleo em biodiesel, para o BMS5 0,02% (m/m), o BER5 0,05% (m/m) e BMR5 0,09% (m/m) aproximadamente. A menor diferença de concentração usada na construção das curvas de calibração para estes modelos foi de 0,25% (m/m). Como os valores do γ^{-1} são menores que 0,25% isso indica que o modelo consegue fazer uma boa distinção entre as amostras.

Tabela 5. Resultados dos parâmetros de figuras de mérito para os modelos B5

| Modelo | BES 5 | BMS 5 | BER 5 | BMR 5 |
|---|--------|---------|--------|--------|
| Sensibilidade ^b | 0,08 | 0,05 | 0,02 | 0,07 |
| Sensibilidade analítica ^a | 12,60 | 48,42 | 20,90 | 11,45 |
| Inverso da sensibilidade analítica ^b | 0,08 | 0,02 | 0,05 | 0,09 |
| Seletividade | 0,23 | 0,15 | 0,07 | 0,21 |
| Máximo sinal-ruído | 568,82 | 2233,20 | 950,31 | 514,23 |
| Mínimo sinal-ruído | 203,87 | 830,90 | 341,37 | 168,09 |
| t_{bias} | 1,9463 | 0,8986 | 0,7587 | 1,3784 |
| $t_{crítico}$ | 2,0595 | 2,0395 | 2,0687 | 2,0639 |
| Limite de Detecção ^a | 0,26 | 0,07 | 0,16 | 0,29 |
| Limite de Quantificação ^a | 0,79 | 0,21 | 0,49 | 0,87 |

^a valores em % (m/m) de óleo

^b valores em % (m/m)⁻¹ de óleo.

A seletividade significa o quanto o método consegue distinguir o sinal do analito na presença de interferentes. Esse valor é entre 0 e 1, onde, quanto mais próximo de 1 for o valor da seletividade, mais seletivo é o método. Ao empregar a seletividade em um método univariado para prever amostras desconhecidas, assume-se essencialmente que o sinal é altamente seletivo para o analito de interesse, ou seja, seletividade próxima de 1. Isso implica que o sinal pode conter uma contribuição significativa de outros componentes se essa contribuição é bem aproximada por uma forma particularmente simples. No caso, de ser praticamente constante, por exemplo, pode ser eliminada efetivamente, por uma correção do branco ou modelado como um intercepto. Tradicionalmente, químicos analíticos, tentam gerar seletividade suficiente pelo melhoramento do método, por meios experimentais ou por meios

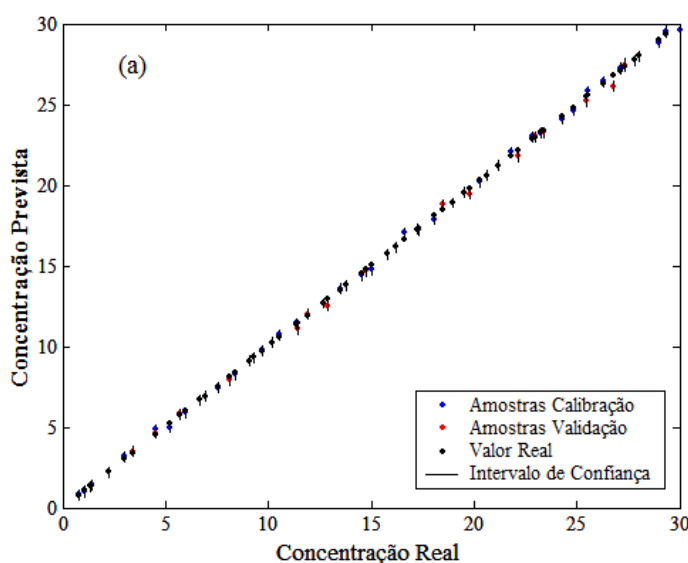
instrumentais. Mas, os métodos tradicionais (univariados) nem sempre trabalham bem com amostras complexas, como o biodiesel, alimentos, ambientais, etc [54].

Em calibração multivariada, as análises são feitas, mesmo com a presença de interferentes, isto é, dados poucos seletivos conforme pode ser visto na Tabela 5. Os valores de seletividade apresentados foram determinados através da razão entre o escalar NAS e a norma do vetor de resposta instrumental representando quanto do sinal é utilizado para a quantificação dos parâmetros.

A razão sinal-ruído mostra o quanto o escalar NAS está acima do desvio padrão da flutuação do sinal instrumental da referência, ou seja, é a razão entre o sinal do analito e o ruído instrumental. Isso significa que, quanto maior essa razão, maior é a quantidade de informação obtida. A Tabela 5 apresenta os altos valores da razão sinal-ruído para todos os modelos B5 e esses valores indicam que os modelos construídos possuem informações do analito muito superiores aos ruídos do instrumento.

Considerando os valores do limite de detecção e quantificação mostrado na Tabela 5, pode-se dizer que os modelos PLS-MIR construídos só podem detectar valor igual ou superior a 0,26% (m/m) para o modelo BES5, enquanto para quantificação, o modelo não consegue determinar valores menores que 0,79% (m/m). Isso indica que os modelos são eficazes para detectar e quantificar adulterantes em B5 na faixa de concentração de 1-30,00% (m/m).

Analizando a Figura 23, observa-se que mais de 95% dos resultados das previsões dos Modelos B5 estão dentro do valor de referência estimado. Se mais que 5% dos valores de referência cair fora da faixa, então o limite de confiança baseado no SEC é questionável.



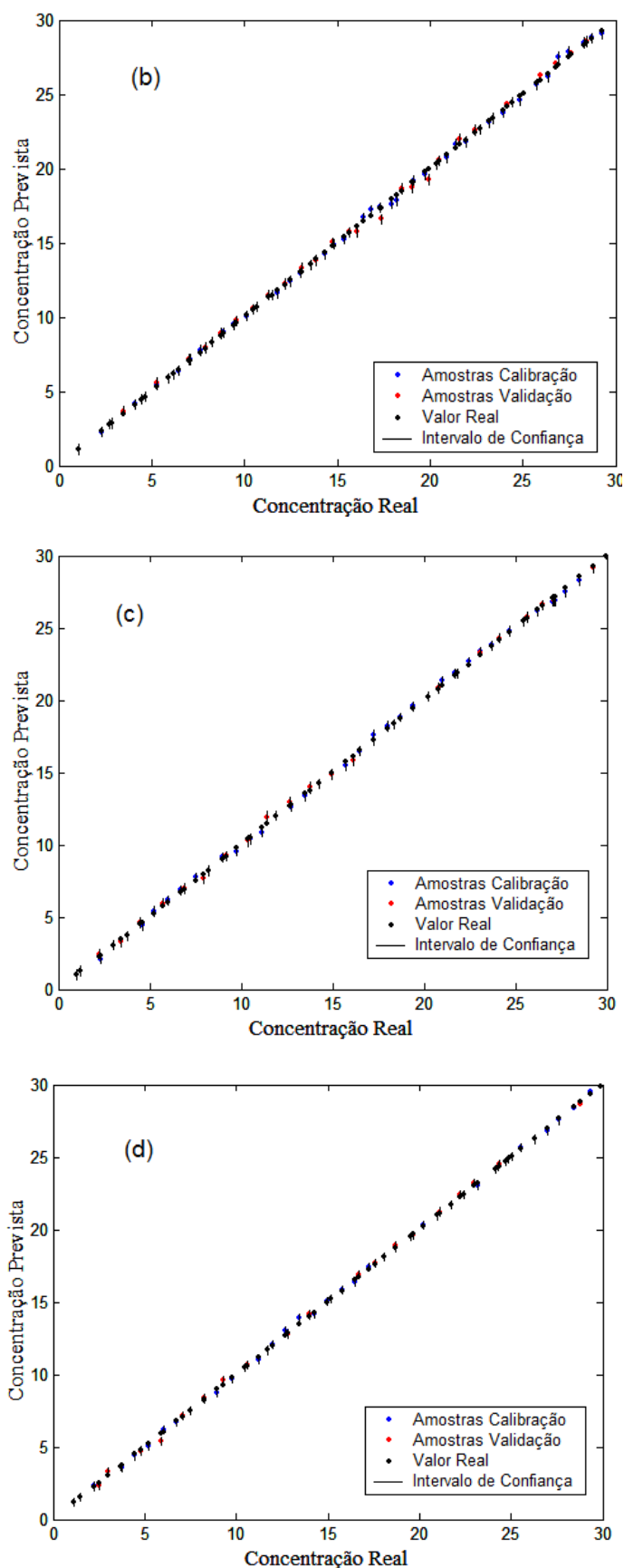
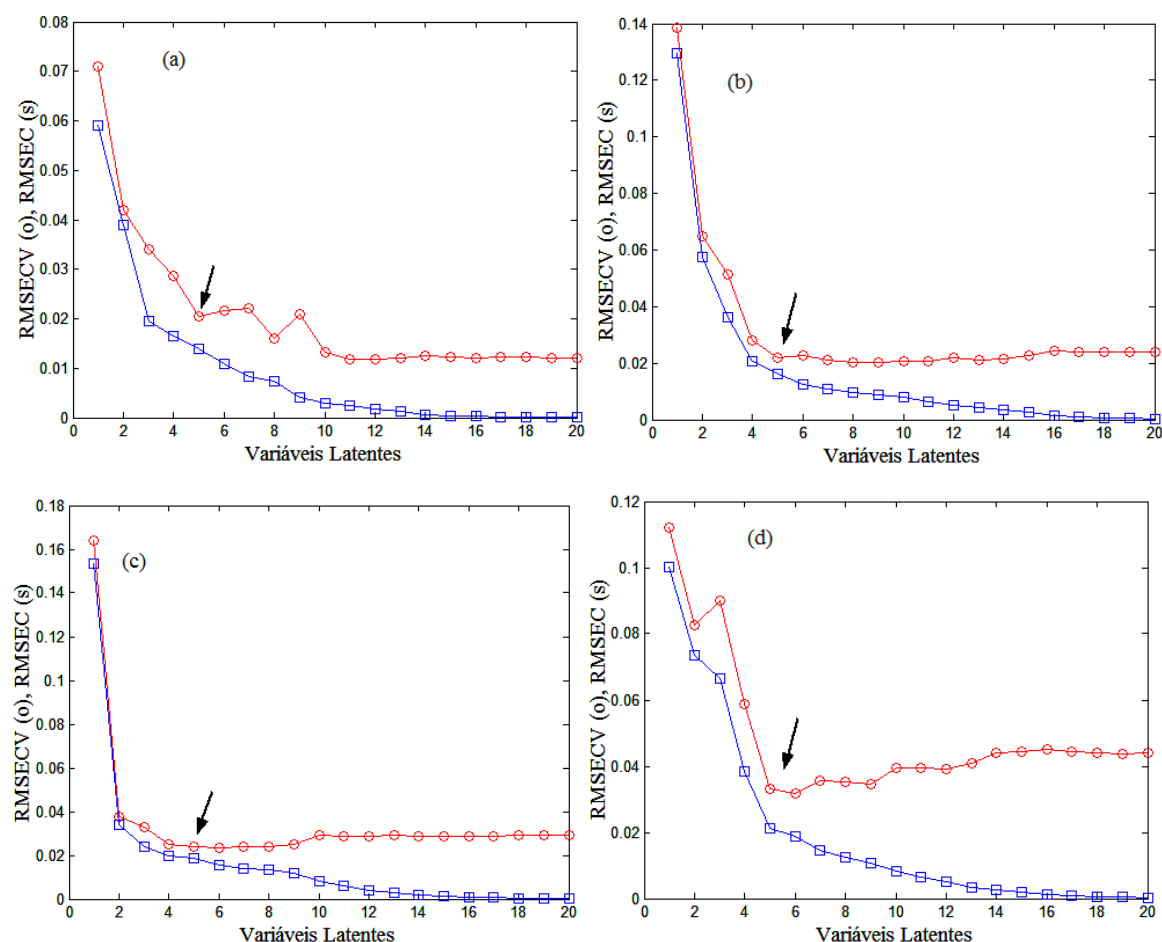


Figura 23. Gráfico de intervalo de confiança para as amostras B5 adulteradas com óleo. BES5(a), BMS5(b), BER5(c) e BMR5(d).

5.1.2 Modelos de biodiesel (B100)

Durante a reação de transesterificação do biodiesel, o álcool geralmente é utilizado em excesso para o favorecimento do equilíbrio na formação dos produtos. Após a reação, o excesso de álcool deve ser separado do biodiesel, uma vez que a presença deste pode reduzir o ponto de fulgor, número de cetano e lubricidade do biodiesel, além de causar problemas de corrosão [66]. De acordo com a Resolução ANP nº 14/12, a quantidade de álcool em biodiesel acima de 0,20% (m/m) se torna um adulterante. Assim, com a aplicação da Espectroscopia no MIR aliada ao PLS tornou-se possível a quantificação deste adulterante em B100.

De acordo com o já citado, o número de amostras utilizadas nos modelos está de acordo com a norma ASTM E1655-05. O número de variáveis latentes foi escolhido conforme a porcentagem de variância explicada nos blocos **X** e **y**, em comparação conjunta com o gráfico do RMSECV mostrado na Figura 24 e na Tabela 6. Por exemplo, para o modelo BMS100, 5VL foram escolhidas com 99,20% da variância explicada em **X** e 99,52 da variância explicada em **y**.



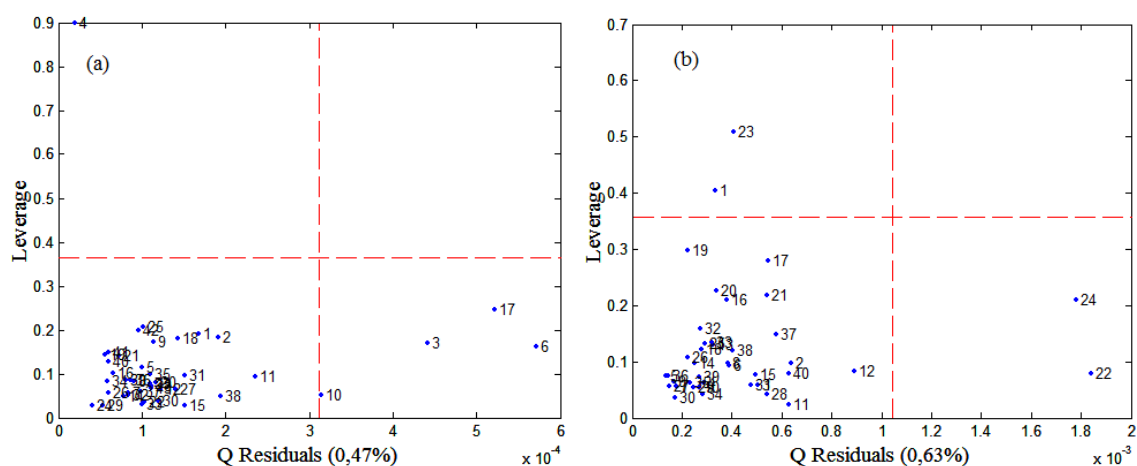
5. Resultados e Discussão

Figura 24. Gráfico de RMSECV para os modelos: (a)BES100, (b)BMS100, (c) BER100 e (d)BMR100

Tabela6. Parâmetros dos modelos B100 construídos.

| MODELO | BES 100 | BMS 100 | BER 100 | BMR 100 |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|
| Adulterante | etanol | metanol | etanol | metanol |
| Nº amostras de cal | 37 | 36 | 41 | 36 |
| Nº amostras de prev | 25 | 20 | 23 | 23 |
| VL | 5 | 5 | 5 | 5 |
| RMSECV % (m/m) | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,03 |
| Variância X (%) | 99,15 | 99,20 | 99,89 | 97,84 |
| Variância Y (%) | 99,67 | 99,52 | 99,50 | 99,22 |

Para os modelos B100, analisando o gráfico de leverage versus resíduos conforme Figura 25, não há amostras com alto leverage e alto resíduo, acima do limite de 95% de confiança.



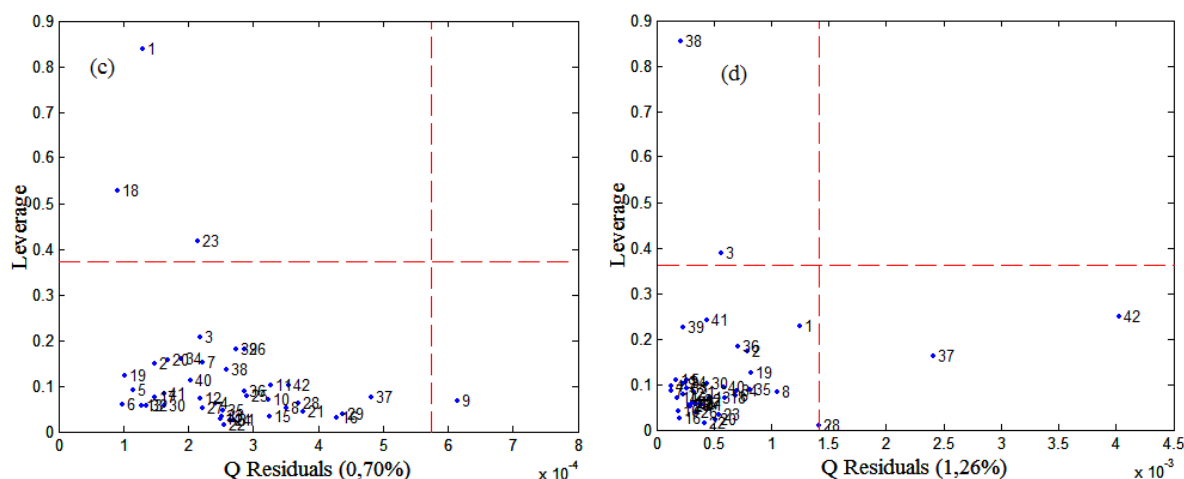


Figura 25. Detecção de amostras anômalas através do gráfico de leverage versus resíduos para os modelos de: (a) BES100, (b) BMS100, (c) BER100(d) e BMR100.

Observando ainda a Tabela 6, verifica-se que tanto no conjunto calibração quanto no de previsão o número de amostras de todos os modelos estão acima do mínimo recomendado pela norma ASTM E1655-05.

Os baixos valores de RMSEC, RMSECV EM e RMSEP mostrados na Tabela 7 demonstram que os modelos de B100 também apresentam uma correlação entre os valores reais e os previstos constatando uma boa exatidão comparada a valores de erros encontrados na literatura [38].

Tabela 7. Resultados de exatidão dos modelos B100.

| MODELO | BES 100 | BMS 100 | BER 100 | BMR 100 |
|---------------|---------|---------|---------|---------|
| RMSEC % (m/m) | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| RMSECV% (m/m) | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,03 |
| RMSEP% (m/m) | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| EM % | 2,83 | 2,69 | 3,00 | 2,76 |

O ajuste do modelo foi verificado de acordo com o gráfico dos valores reais versus valores previstos como mostrado na Figura 26. Observa-se que as amostras estão distribuídas ao longo da reta e bem próximas da regressão. Além disso, os valores reais estão correlacionados com os valores previstos pelos modelos. As amostras de previsão estão

5. Resultados e Discussão

dentro da faixa de concentração para os quais os modelos foram desenvolvidos indicando que não há extrapolação.

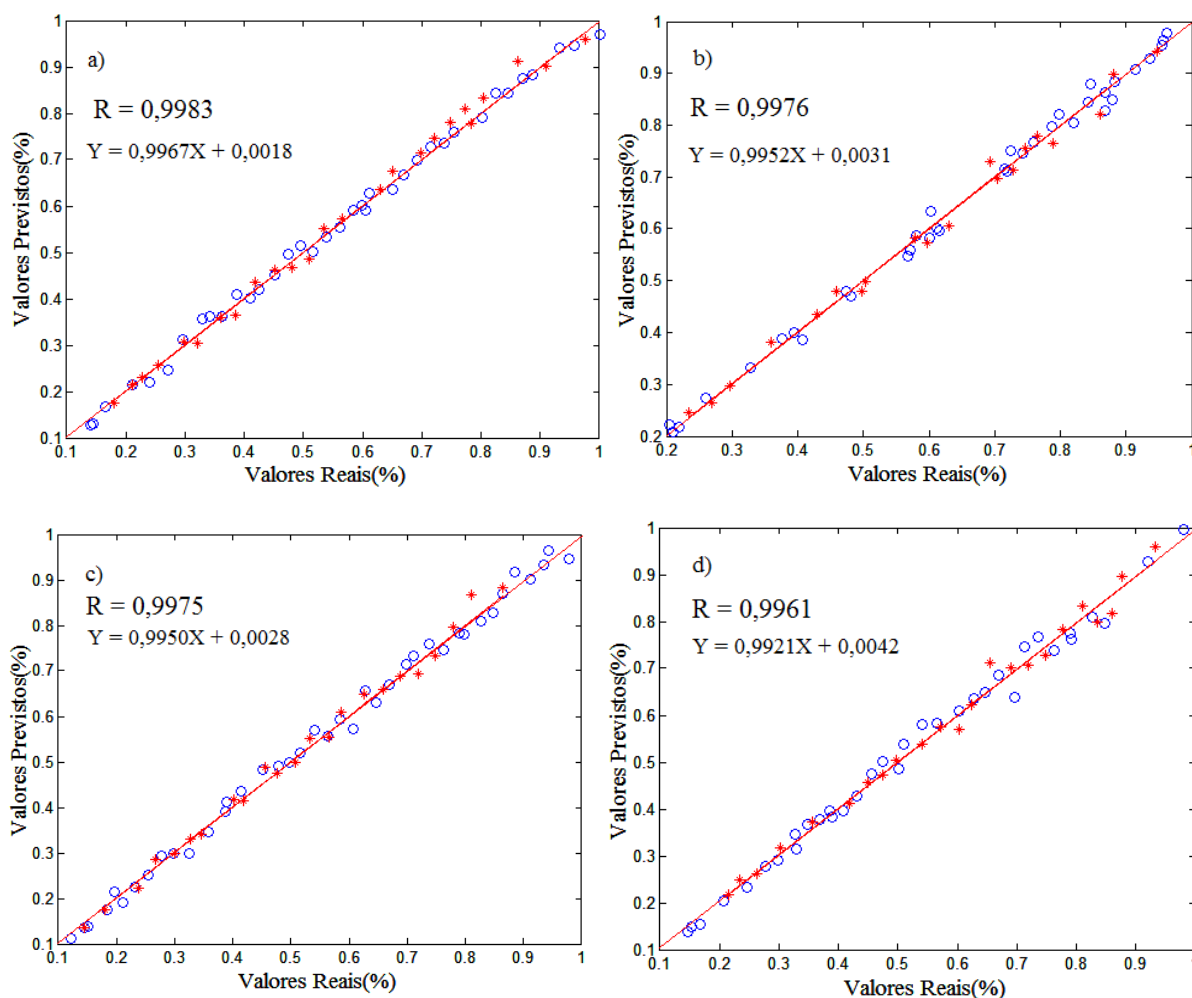


Figura 26. Ajuste para as amostras de B100 adulteradas com álcool: (a) BES100 (b) BMS100 (c) BER100 e (d) BMR100.

Avaliando o ajuste também através do gráfico do NAS versus concentração na Figura 27 que o NAS demonstrou uma boa linearidade, conforme indicado pelo R acima de 0,99, além de mostrar uma distribuição uniforme ao longo da curva de calibração.

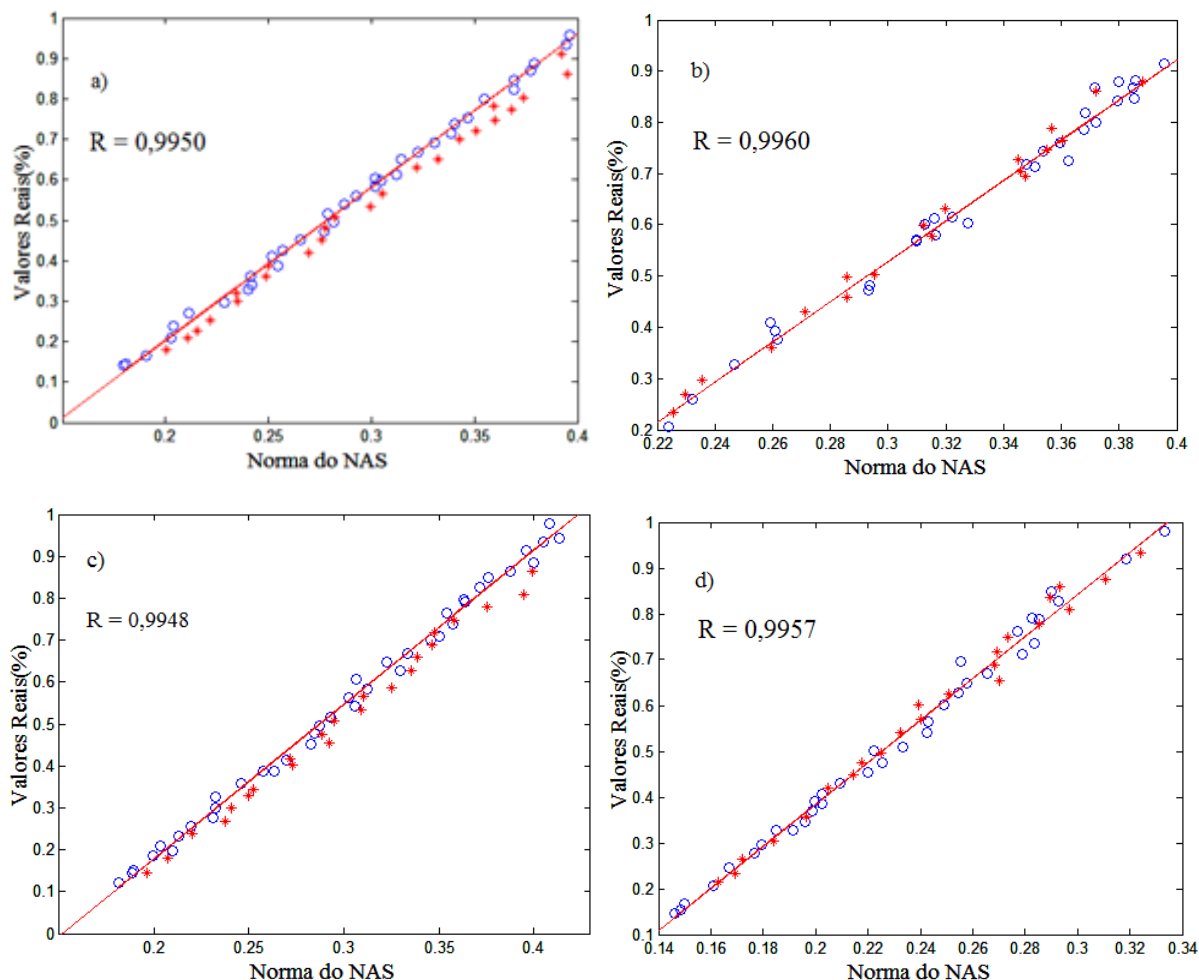


Figura 27. Norma do NAS versus valores de referência das concentrações para as amostras de calibração e validação: (a) BES100 (b) BMS100 (c) BER100 e (d) BMR100.

A Figura 28 mostra o gráfico de erros das amostras de B100 adulteradas com álcool. Observando a aleatoriedade dos modelos pode-se dizer que eles são lineares e não há dependência entre os erros e nem presença de amostras atípicas. Além disso, é possível verificar que os maiores valores de erros absolutos para os modelos PLS B100 foram de 0,06% (m/m) que corresponde a um erro relativo abaixo de 7,5%.

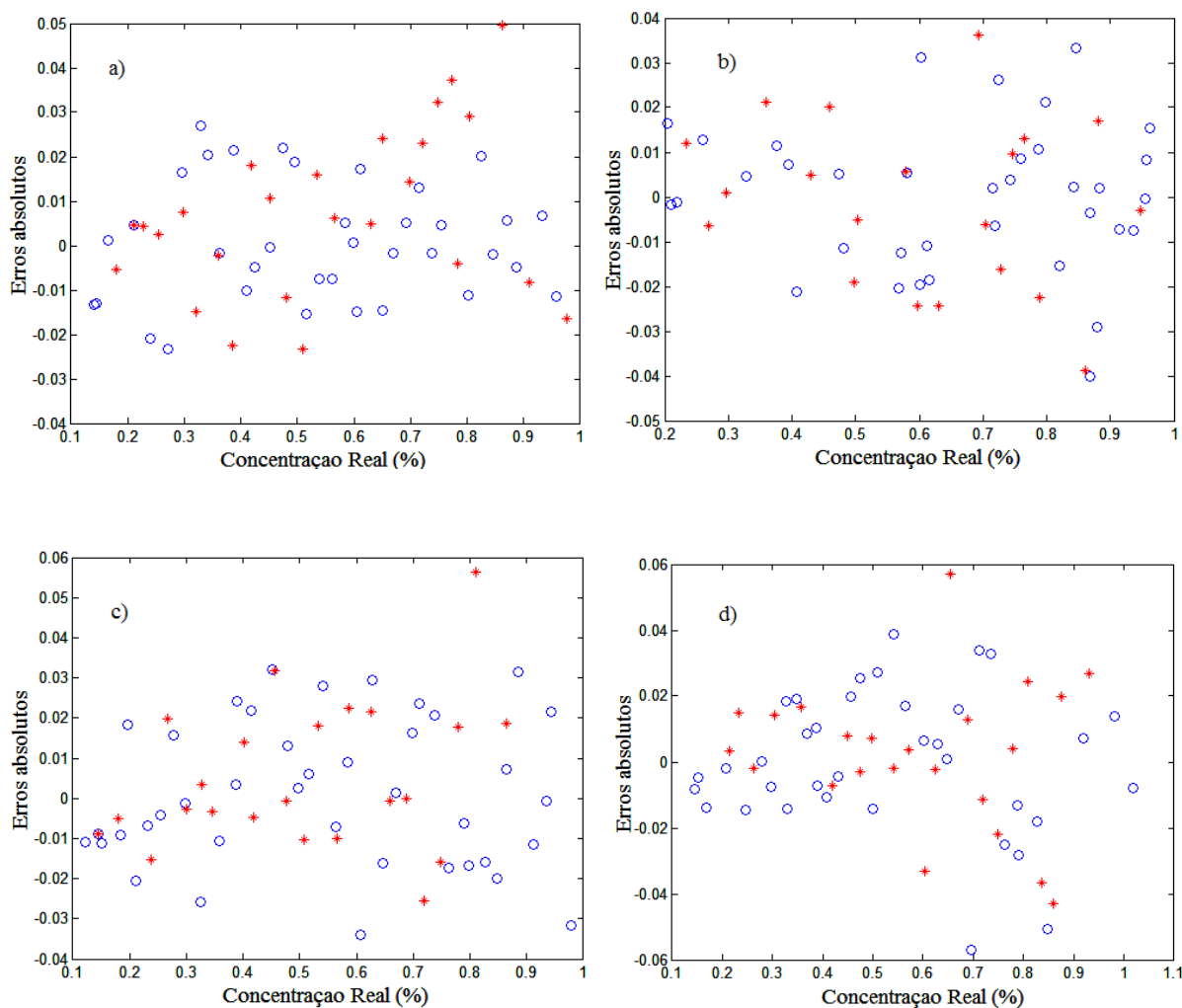


Figura 28. Gráfico de erros para as amostras de B100 adulteradas com álcool. (a)BES100, (b)BMS100, (c), BER100 e (d)BMR100.

A ausência de erro sistemático nas amostras de previsão foi verificada através de um teste t-Student com graus de liberdade igual ao número de amostras do conjunto de previsão e nível de confiança de 95%. Comparando o t_{bias} com o $t_{crítico}$, apresentado na Tabela 8, verifica-se que os valores de $t_{crítico}$ estão acima dos valores de t_{bias} o que indica a ausência de tendência sistemática nos resultados.

Para avaliar a sensibilidade do modelo foi calculada a sensibilidade analítica que consiste na razão de sensibilidade com a norma do desvio padrão do branco. O inverso desse parâmetro, apresentado na Tabela 8, indica a diferença de concentração que o modelo consegue distinguir entre uma amostra e outra. Então, para o modelo BES100 é possível fazer a distinção de amostras com diferença de concentração 0,003% de álcool em biodiesel, para o BMS100 0,010%, o BER100 0,003% e BMR100, 0,005% aproximadamente. Como os valores

5. Resultados e Discussão

do γ^{-1} são menores que 0,0034% isso indica que o modelo consegue fazer uma boa distinção entre as amostras, ao passo que durante a construção dos modelos foram utilizados intervalos de concentração de 0,025%.

Os valores da razão sinal-ruído de acordo com a Tabela 8 são altos. Isso significa que, quanto maior essa razão, maior é a quantidade de informação obtida. Os valores apresentados indicam que os modelos construídos possuem informações do analito muito superiores aos ruídos do instrumento.

Considerando os valores do limite de detecção e quantificação, pode-se dizer que os modelos PLS-MIR construídos só podem detectar valores iguais ou superiores a 0,03% (m/m) para o modelo BMS100, enquanto para quantificação, o modelo não consegue determinar valores menores que 0,03% (m/m). Isso indica que os modelos são eficazes para detectar e quantificar adulterantes em B100 na faixa de concentração de 0,14-1,00% (m/m).

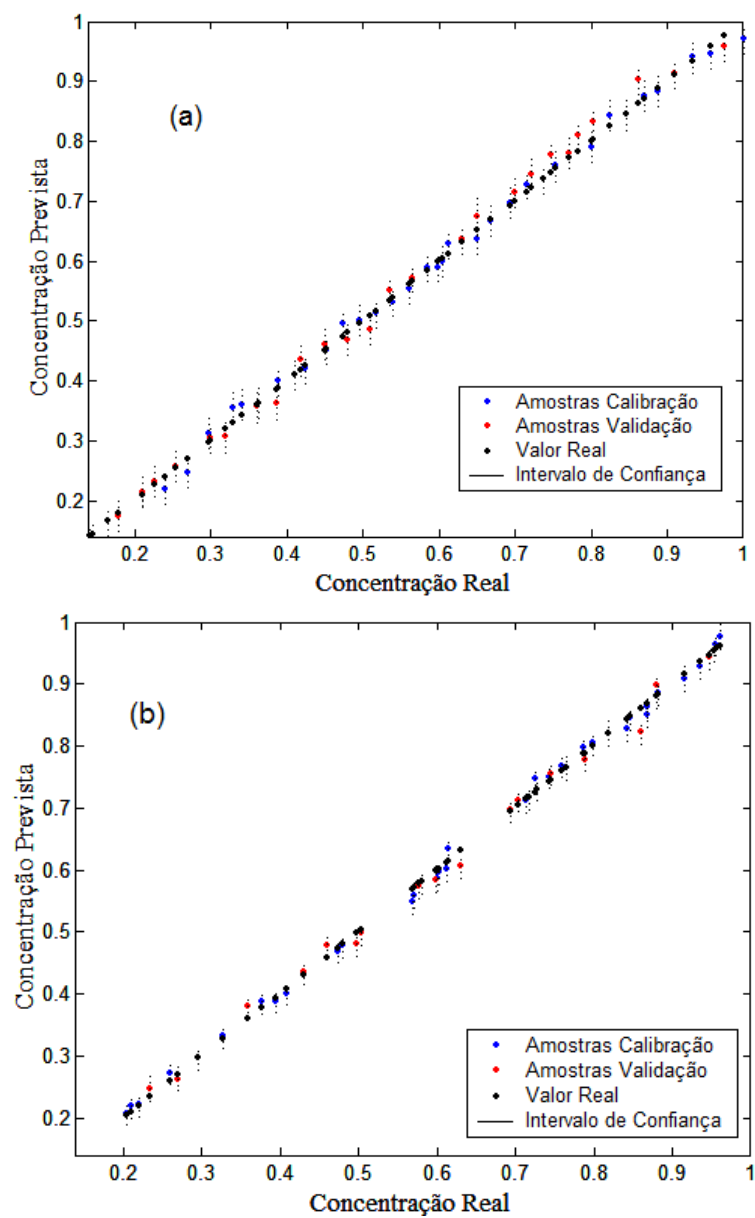
Tabela 8. Resultados dos parâmetros de figuras de mérito para os modelos B100.

| Parâmetro | MODELO | | | |
|---------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | BES 100 | BMS 100 | BER 100 | BMR 100 |
| Sensibilidade ^b | 0,26 | 0,25 | 0,27 | 0,22 |
| Sensibilidade analítica ^a | 291,85 | 102,23 | 291,70 | 186,90 |
| Seletividade | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| Inverso da sensibilidade ^b | 0,003 | 0,010 | 0,003 | 0,005 |
| Máximo sinal-ruído | 444,90 | 166,88 | 455,87 | 288,42 |
| Mínimo sinal-ruído | 198,90 | 88,33 | 207,07 | 125,15 |
| t _{bias} | 1,8693 | 0,3029 | 1,3508 | 0,4698 |
| t _{crítico} | 2,0595 | 2,0860 | 2,0687 | 2,0687 |
| Limite de Detecção ^a | 0,01 | 0,03 | 0,01 | 0,02 |
| Limite de Quantificação ^a | 0,03 | 0,09 | 0,03 | 0,05 |

^a valores em % (m/m) de álcool

^b valores em % (m/m)⁻¹ de álcool.

De acordo com os gráficos de intervalos de confiança mostrados na Figura 29, observa-se que menos de 5% das amostras de referência para todos os modelos B100 saiu da faixa, então o limite de confiança baseado no SEC não é questionável.



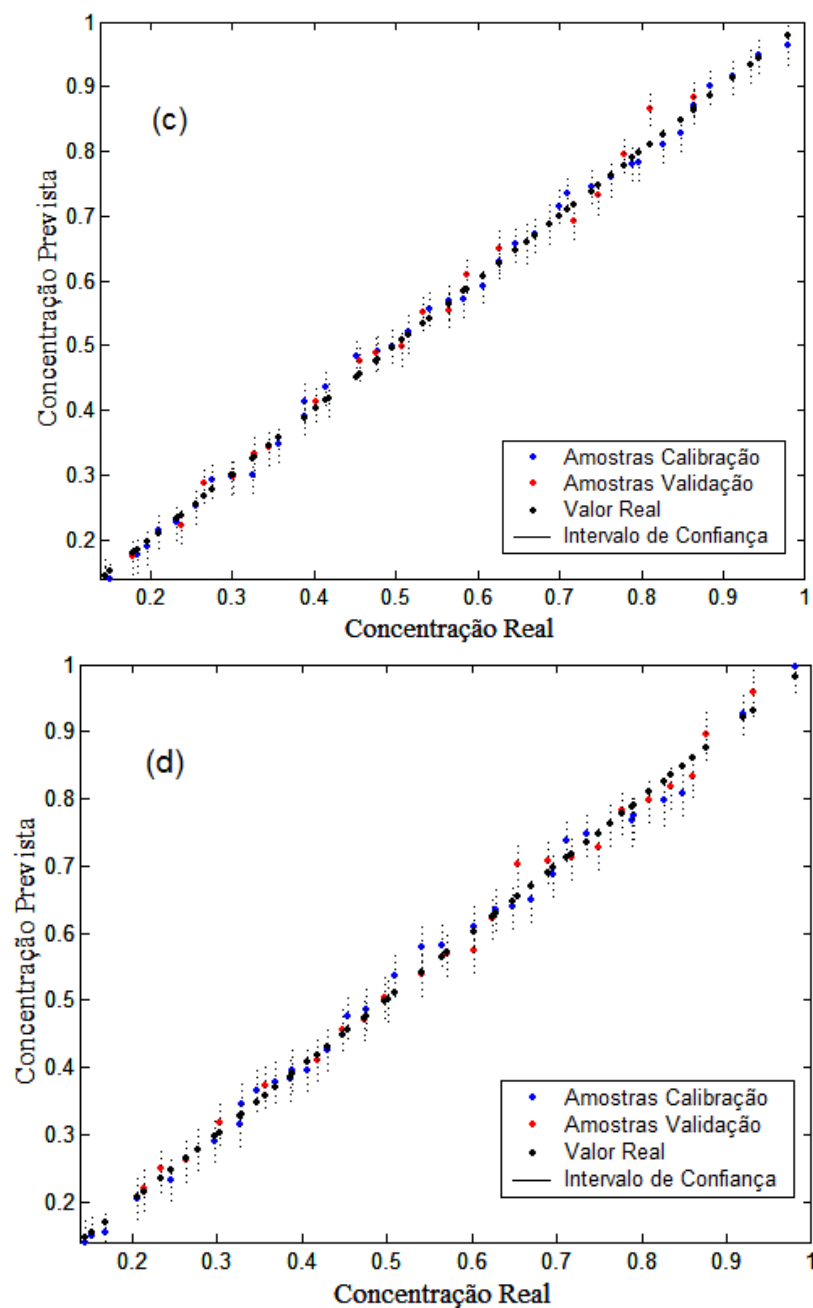


Figura 29. Gráfico de intervalo de confiança para as amostras B100 adulteradas com álcool (a) BES100, (b) BMS100, (c) BER100 e (d) BMR100.

6. CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

As metodologias desenvolvidas usando a técnica de Espectroscopia no Infravermelho Médio com Reflectância Total Atenuada e aliada ao método de calibração multivariada por PLS foram eficientes na quantificação de adulterantes (óleos vegetais, etanol e metanol) nos biodieseis, tanto metílico quanto etílico, de soja e óleo residual e em suas misturas com diesel.

Os modelos PLS construídos baseados nas recomendações da norma ASTM E1655-05 apresentaram erros satisfatórios abaixo de 3,01%, não apresentando erros sistemáticos e presença de amostras anômalas.

A validação dos modelos construídos através do cálculo do NAS e figuras de mérito permitiu avaliar a eficácia e confiabilidade, demonstrando que os métodos são adequados para as condições nas quais serão aplicados. Os resultados dos parâmetros de mérito foram aceitáveis conforme a norma ASTM E1655-05 apresentando alta correlação e baixos valores de erros. Os modelos apresentaram altos valores da relação sinal/ruído o que significa serem capazes de discernir o que é ruído e o que é sinal analítico. Também conseguem diferenciar valores muito baixos de concentração, pois apresentam valores baixos do inverso da sensibilidade analítica ($< 0,09\%$).

As metodologias desenvolvidas no trabalho utilizando Espectroscopia MIR-HATR aliada ao método PLS são eficientes, rápidas, diretas, econômicas e preservam as amostras. Tais vantagens as tornam alternativas viáveis quando comparadas à técnica padrão (Cromatografia em fase Gasosa), além de viabilizar a realização de análises *in situ*, possibilitando diversas aplicações em análises de rotina. Essas metodologias podem ser implementadas no controle de qualidade desse combustível por órgãos fiscalizadores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] PNPB – (Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel) disponível em: <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/programa/historico.html> acesso em: (02/12/2013).
- [2] MAPA -Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário estatístico de agroenergia 2012. Secretaria de Produção e Agroenergia. Brasília: MAPA/ACS, 2013.284p.
- [3] ALVES, J.C.; POPPI, R.J. Biodiesel content determination in diesel fuel blends using near infrared (NIR) spectroscopy and support vector machines(SVM). *Talanta*, v.104,p.155-161, 2013.
- [4] ABIOVE - Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais.disponível em: www.abiove.com.br acessado em: 30/11/2013.
- [5] SABUDAK, T.; YILDIZ, M. Biodiesel production from waste fryin oils and its quality control, *Waste Management*, v.30, p.799-803, 2010.
- [6] MONTEIRO, M.; AMBROZIN, A.; LIAO, L.; FERREIRA, A. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization, *Talanta*,v. 77, p.593-605, 2008.
- [7] BASSBASI, M.; HAFID, A.; PLATIKANOV, S.; TAULER, R.; OUSSAMA A. Study of motor oil adulteration by infrared spectroscopy and chemometrics methods, *Fuel*,v. 104, p. 798-804, 2013.
- [8] OLIVEIRA, F. C. C.; BRANDÃO, C. R. R.; RAMALHO, H. F.; COSTA, L. A. F.;SUAREZ, P. A. Z.; RUBIM, S. J. C. Adulteration of diesel/biodiesel blends by vegetable oil as determined by Fourier transform (FT) near infrared spectrometry and FT-Raman spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, v. 587, p. 194-199, 2007.
- [9] ANP Agência Nacional do Petróleo e Gás Natural e biocombustíveis.Resolução 04/2012. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>, acesso em 03/12/2013.
- [10] KILLNER, M. H. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; PASQUINI, C. A PLS regression model using NIR spectroscopy for on-line monitoring of the biodiesel production reaction, *Fuel*, v.90, p. 3268-3273, 2011.
- [11] LAVINE, B.; WORKMAN, J. Chemometrics, *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 4519-4531,2008.
- [12] INMETRO Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial DOQ-CGRE-008- Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, 2010.
- [13] VALDERRAMA,P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada, *Química Nova*. v.32, p.1278-1287, 2009.

7. Referências Bibliográficas

- [14] BEN -Boletim Energético Nacional. Disponível em: <http://www.ben.epe.gov.br>, acesso em 03/12/2013.
- [15] LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. D.; Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos, *Química Nova*, v.32, p.1596-1608, 2009.
- [16] KNOTHE, G.; K. R. STEIDLEY. A comparison of used cooking oils A very heterogeneous feedstock for biodiesel, *Bioresource Technology*. v.100, p. 5796-5801, 2009.
- [17] FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. D. S.; A. SCABIO. Biodiesel de soja- taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia, *Química Nova*, v.28, p.19-23, 2005.
- [18] MEHER, L. C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review, *Renewable and Sustainable energy Reviews*, v.10, p.248-268, 2006.
- [19] COSTA NETO, P. R.; ROSSI, R. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v. 23, p.531-534, 2000.
- [20] LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, v. 87, p. 1083-1095, 2010.
- [21] FERNANDES, D. M. Obtenção e caracterização físico- química dos biodieseis metílico e etílico de algodão. Dissertação. (Mestrado em Química)-Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Julho, 2011.
- [22] SOARES, I. P.; RUSSO, R. M. D. O.; PRATES, R. G. D.; AUGUSTI, R.; FORTES, I. C. P.; PASA, V. M. D. Avaliação da eficiência das técnicas ESI-MS e ATR-FTIR na determinação de adulteração em BX com querosene e óleo residual, *Química Nova*, v.34, p.1439-1442, 2011.
- [23] MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production, A review. *Bioresource Technology*, v.70, p. 1-15, 1999.
- [24] Ministério de Minas e Energia. Boletim Mensal de Combustíveis Renováveis. Disponível em: www.mme.gov.br/, acessado em: 29/11/2013.
- [25] MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. www.agricultura.gov.br, acessado em: 03/12/2013.
- [26] SABESP - Companhia de Saneamento básico do Estado de São Paulo. Disponível: www.sabesp.com.br/, acessado em: 25/11/2013.
- [27] PORTELA, F. M. Efeito da catálise Ácida e Alcalina na Produção e Propriedades Físico-Químicas do Biodiesel Metílico de Pinhão-Manso. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Julho, 2011.

7. Referências Bibliográficas

- [28] LIMA, A. L.; LIMA, A. P. ; PORTELA, F. ; SANTOS, D.Q. ; BORGES NETO, W. ; HERNANDEZ-TERRONES, M. G. Parâmetros da transesterificação etílica com óleo de milho para produção de biodiesel. *Eclética Química* (UNESP. Araraquara. Impresso), v. 35, p. 101-106, 2011.
- [29] PEREIRA, N. R. Estudos Oleoquímicos e Obtenção de Ésteres Metílicos e Etílicos a partir de óleos do *Dipteryx ala vog* (baru). Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- [30] SILVA, T. A. R. ; NETO, W. B. Estudo da Redução da Acidez do Óleo Residual para a Produção de Biodiesel utilizando o Planejamento Fatorial Fracionado. *Revista Virtual de Química*, v. 5, p. 828-839, 2013.
- [31] SANTOS, D. Q.; VIEIRA , D. F. Determinação de coeficiente de expansão térmica do biodiesel e seus impactos no sistema de medição volumétrico. *Eclética Química*, v. 35, p.107-112, 2010.
- [32] SILVA, T. A. R.; NETO, W. B.; SANTOS D.Q. ; LIMA, A. P. Model for the correction of the specific gravity of biodiesel from residual oil. *Independent Journal of Management & Production*, v. 4, p. 136-147, 2013.
- [33] GONTIJO, L. C.; GUIMARÃES, E.; MITSUTAKE, H.; SANTANA, F. B.; SANTOS, D. Q.; NETO,W. B. Quantification of soybean biodiesels in diesel blends according to ASTM e 1655 using mid-infrared spectroscopy and multivariate calibration, *Fuel*. v.117, p.1111-1114, 2014.
- [34] FONSECA, F.S. Espectrometria no infravermelho médio e calibração multivariada por PLS para quantificação de biodiesel metílico e etílico de soja, milho e girassol em misturas com diesel. Dissertação de mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.
- [35] MEIRA, M.; QUINTELLA, C. M.; FERRER, T. M.; SILVA, H. R. G.; GUIMARÃES, A. R.; SANTOS, M. A.; COSTA NETO, P.R.; PEPE, I.M. Identificação de adulteração de biocombustível por adição de óleo residual ao diesel por espectrofluorimetria total 3d e análise de componentes principais, *Química Nova*, v.34, p. 621-624, 2011 .
- [36] ALBERICI, R. M.; SIMAS, R. C.; SOUZA, V.; SÁ, G. F.; DAROBA, R. J.; EBERLIN, M. N. Analysis of fuels via easy ambient sonic- spray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 659, p.15-22, 2010.
- [37] CORGOZINHO, C. N. C.; PASA, V. M. D.; BARBEIRA, P. J. S. Determination of residual oil in diesel oil by spectrofluorimetric and chemometrics analysis, *Talanta*, v.76 p. 479-484, 2008.
- [38] KUMAR, K.; MISHRA, A. K. Quantification of ethanol in ethanol-petrol and biodiesel in biodiesel-diesel blends using fluorescence spectroscopy and multivariate methods, *Journal of Fluorescence*, v.22, p. 339-347, 2012.

7. Referências Bibliográficas

- [39] BRANDÃO, L. F. P.; BRAGA, J. W. B.; SUAREZ, P. A. Z. Determination of vegetable oils fats adulterants in diesel oil by high performance liquid chromatography and multivariate methods, *Journal of cromatography A*, v.1225, p. 150-157, 2012.
- [40] BARBOSA, Luiz Cláudio de Almeida. *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de composto orgânicos*. Ed. da UFV, 2007, Viçosa, MG.
- [41] SKOOG, D.A.; HOLLER, f. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5. ed. são Paulo: Bookman, 2002.
- [42] SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- [43] FERRÃO, M. F.; VIERA, M. S.; PAZOS, R. E. P.; FACHINI, D.; GERBASE, A. E.; MARDER, L. Simultaneous determination of quality parameters of biodiesel/diesel blends using HATR-FTIR spectra and PLS, iPLS or siPLS regressions. *Fuel*, London, v. 90, p.701–706, 2011.
- [44] OLIVEIRA, J.S.; MONTALVÃO, R.; DAHER, L.; SUAREZ, P.A.Z.; RUBIM, J.C. Determination of methyl ester contents in biodiesel blends by FTIR-ATR and FTNIR spectroscopies. *Talanta* 69 (2006), p. 1278 –1284.
- [45] VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L.; BUYDENS, L. M. C.; JING, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-VERBEKE, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- [46] BRERETON, R. G. *Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry*, *Analyst*, 125, 2125, 2000.
- [47] MARTENS, H.; NAES, T. *Multivariate calibration*. New York: Wiley, 1996.
- [48] BEEBE, K. R.; KOWALSKI, B. R. An Introduction to Multivariate Calibration and Analysis, *Anal. Chem.*, 59, 17, 1007A-1017A, 1987.
- [49] GELADI, P.; KOWALSKI, B. Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. *Analytical Chimica Acta*. 1986, 185, p. 1.
- [50] De JONG, S. SIMPLS - an alternative approach to partial least-squares regression. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* **1993**, 18, (3), 251-263.
- [51] MILLER, J. N.; MILLER, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. London: Prentice Hall, 2000.
- [52] OTTO, M. *Chemometrics – Statistics and Computer application in Analytical Chemistry*, Weinheim: Wiley, 1999.
- [53] NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E, 25 anos de quimiometria no Brasil, *Química Nova*, v. 29, p.1401-1406, 2006.

7. Referências Bibliográficas

- [54] OLIVIERI, A. C.; FABER, N. M.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.; KALIVAS, J. H.; MARK, H. Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, v. 78, p. 633-661, 2006.
- [55] FERRE, J.; BROWN, S. D.; RIUS, F. X. Improved calculation of the net analyte signal in inverse multivariate calibration, *Journal of Chemometrics*. 2001, 15, 537-553.
- [56] GOICOECHEA, H. C.; OLIVIERI, A. C. A comparison of orthogonal signal correction and net analyte signal preprocessing methods. Theoretical and experimental study, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v.56, p.73-81, 1998.
- [57] FABER, N. M. Exact presentation of multivariate calibration model as univariate calibration graph, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v.50, p. 107-114, 2000.
- [58] FABER, N. M. Mean centering and computation of scalar net analyte signal in multivariate calibration, *Journal of Chemometrics*, v.12, p.405-409, 1998.
- [59] BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Figures of merit for determination of the polymorphic purity of carbamazepine by infrared spectroscopy and multivariate calibration, *Journal of Pharmaceutical Science*, v.93, p.2124-2134, 2004.
- [60] MUÑOZ DE LA PENA, A.; ESPINOSA-MANSILLA, A.; ACEDO VALENZUELA, M. I.; GOICOECHEA, H. C.; OLIVIERI, A. C. Comparative study of net analyte signal-based 128 methods and partial least squares for the simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid by stopped-flow kinetic analysis, *Analytica Chimica Acta*, v.463, p.75-88, 2002.
- [61] ASTM Standards. *Standards practices for infrared, multivariate, quantitative analysis*, E1655-05. ASTM International, West Conshohocken, USA, 2012.
- [62] BOQUÉ, R.; RIUS, F. X. Multivariate detection limits estimators, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v.32, p.11-23, 1996.
- [63] ROCHA, W. F.; NOGUEIRA, R.; VAZ, B. G. Validation of model of multivariate calibration: an application to the determination of biodiesel blend levels in diesel by near-infrared spectroscopy, *Journal of Chemometrics*, v. 26, p. 456-461, 2012 .
- [64] VASCONCELOS, F.V.C; JUNIOR, P.F.B.S; PIMENTEL, M.F; PONTES, M.J.C; PEREIRA, C.F. Using near-infrared overtone regions to determine biodiesel content and adulteration of diesel/biodiesel blends with vegetables oils, *Analytica Chimica Acta*, v.716, p. 101-107, 2012.
- [65] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Resolução RE nº899*, de 29/05/2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>, acessado em: 29/11/2013.
- [66] QUADROS, D.P. C; CHAVES, E.S; SILVA, J.S. A; TEIXEIRA, L.S. G; CURTIUS, A.J; PEREIRA, P.A.P. Contaminantes em Biodiesel e Controle de Qualidade, *Revista Virtual de Química*, v.3, p. 376-384, 2011.

7. Referências Bibliográficas

[67] PERKINELMER. FT-IR Spectroscopy: Attenuated Total Reflectance (ATR). Technical Note (2005). Disponível em: <www.perkinelmer.com>. Acesso em: 07 out. 2009.