

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

TATHIANA DIENIFER GODINHO

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BIODIESEL DE CRAMBE EM DIESEL
USANDO PLS-DA E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE
HIDROGÊNIO (RMN ¹H)**

UBERLÂNDIA

2022

TATHIANA DIENIFER GODINHO

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BIODIESEL DE CRAMBE EM DIESEL
USANDO PLS-DA E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE
HIDROGÊNIO (RMN ¹H)**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto

UBERLÂNDIA

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais e aos meus irmãos, por sempre demonstrarem apoio e confiança nas escolhas que fiz em minha vida, agradeço em especial minha mãe Ana Maria Aparecida Silva Godinho, que sempre acreditou que sou capaz e não mediu esforços para me ajudar nessa caminhada.

Ao meu orientador, Professor Waldomiro Borges Neto, por dividir seus conhecimentos e ensinamentos comigo.

Aos integrantes do Laboratório de Quimiometria do Triângulo, pelos momentos de aprendizado compartilhados.

Agradeço por fim, a todos que fizeram parte de minha jornada até aqui.

Continue a nadar...

Procurando Nemo

RESUMO

Diante do crescimento da demanda por fontes alternativas de energia, se tornou necessário o estudo e desenvolvimento de combustíveis renováveis, dentre eles o biodiesel. Com a finalidade de se obter confiabilidade no controle de qualidade da mistura biodiesel/diesel este trabalho utilizou o método quimiométrico PLS-DA aplicado a dados RMN para determinar a porcentagem de biodiesel de crambe em mistura com diesel. O modelo gerado foi capaz de discriminar corretamente misturas contendo $10,0 \pm 0,5\%$ (v/v) biodiesel metílico de crambe/diesel de outras amostras com concentração variante entre 1,0 a 30,0% (v/v) biodiesel-diesel. Possuindo RMSEC = 0,2% (v/v), RMSECV = 1,4% (v/v) e RMSEP = 0,2% (v/v), com *threshold* definido em 0,36. O modelo foi validado segundo os parâmetros de mérito da Tabela de confusão.

Palavras chave: Biocombustíveis; Classificação Multivariada; controle de qualidade; PLS-DA; Quimiometria.

ABSTRACT

Given the growing demand for alternative energy sources, it became necessary to study and develop renewable fuels, including biodiesel. In order to be reliable in the quality control of this fuel, controlling the percentage of biodiesel present in mixtures with diesel oil, this work was developed, using the chemometric method Discriminant Analysis by Partial Least Squares (PLS-DA) applied to data from Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR). The generated model is able to correctly discriminate mixtures containing $10.0 \pm 0.5\%$ (v/v) methyl biodiesel from crambe-diesel from other samples with variant concentration between 1.0 to 30.0% (v/v) biodiesel-diesel, with RMSEC = 0.2% (v/v), RMSECV = 1.4% (v/v) and RMSEP = 0.2% (v/v), with threshold set at 0.36. The model was validated according to the merit parameters of the Confusion Table.

Keywords: Biofuels; Multivariate Classification; quality control; PLS-DA; Chemometric.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas da reação de transesterificação de um triglicerídeo	12
Figura 2 - Série histórica da produção brasileira de biodiesel.....	13
Figura 3 - (a) Lavoura de crambe e (b) destaque dos frutos.....	14
Figura 4 - Registro de não conformidades encontradas no diesel comercial	15
Figura 5 - Técnica aplicada à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	21
Figura 6 - Espectros de RMN ¹ H para as 76 amostras das misturas biosiesel de crambe-diesel.....	25
Figura 7 - Gráfico para detecção de amostras anômalas	26
Figura 8 - Modelo PLS-DA discriminando amostras com 10,0% (v/v) de biodiesel metílico de crambe em diesel das amostras com diferentes porcentagens da mistura ...	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Figuras de Mérito empregadas na avaliação do modelo PLS-DA	19
Tabela 2 - Tabela de Confusão do modelo PLS-DA	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AGL – Ácidos Graxos Livres

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

B10 – Combustível comercial composto por 90% de óleo diesel e 10% de biodiesel

B100 – Biodiesel puro

CCM – (do inglês) Coeficiente de Correlação de Matthew's

NBR – Norma Técnica Brasileira

PLS-DA – (do inglês) Análise discriminante por Quadrados Mínimos Parciais

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (ou de prótons)

RMSE – (do inglês) Erro Quadrático Médio

RMSEC – (do inglês) Erro Quadrático Médio de Calibração

RMSECV – (do inglês) Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada

RMSEP – (do inglês) Erro Quadrático Médio de Previsão

TAG – Triacilglicerídeos

VL – Variável Latente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. O Biodiesel	10
1.2. O mercado de biodiesel.....	13
1.3. Crambe.....	14
1.4. Controle de Qualidade	15
1.5. Quimiometria.....	16
1.5.1. Análise de Componentes Principais (PCA).....	16
1.5.2. Quadrados Mínimos Parciais (PLS)	17
1.5.3. Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA)	18
1.5.4. Validação do modelo PLS-DA.....	18
1.6. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H).....	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. Geral.....	22
2.2. Específicos	22
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
3.1. Produção do biodiesel metílico de crambe	23
3.2. Preparação das amostras	24
3.3. Aquisição dos espectros de RMN ¹ H e construção do modelo PLS-DA.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1. Caracterização dos espectros de RMN ¹ H	25
4.2. Modelo PLS-DA	26
4.3. Validação do modelo PLS-DA.....	28
5. CONCLUSÃO	29
6. REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

Alternativas mais sustentáveis e consumo consciente têm se tornado prioridade para muitas pessoas. Estamos vivendo um despertar em relação a temas como sustentabilidade e metas de redução de gases. Cada vez mais a sociedade está investindo em ações coletivas, em que todo mundo quer ir para o mesmo lado: o da sustentabilidade.

Vale ressaltar que as fontes de energia derivadas de combustíveis fósseis, são utilizadas há mais de um século. Durante esse período, muitos impactos foram ocasionados ao planeta, devido principalmente a liberação do dióxido de carbono durante a queima desses combustíveis. Entre as consequências estão a poluição ambiental e, principalmente, a ascensão do aquecimento global.

Nesta linha de raciocínio, o biodiesel ganha destaque em equilibrar alto poder energético, não requerer mudanças significativas nos motores de combustão e suas matérias primas serem de origem vegetal que, além de renováveis, retiram dióxido de carbono da atmosfera (KONUR, 2021).

Com o aumento do uso do biodiesel se faz necessário o uso de métodos de controle de qualidade, que entre outros parâmetros façam a determinação do teor de biodiesel na mistura com diesel, nesse trabalho vou apresentar o método de classificação de teor de biodiesel em diesel – o PLS-DA. Que pode modelar dados advindos de várias técnicas, como Infravermelho, UV-Vis, Espectrômetro de Massas e RMN – que foi a técnica escolhida para o presente trabalho.

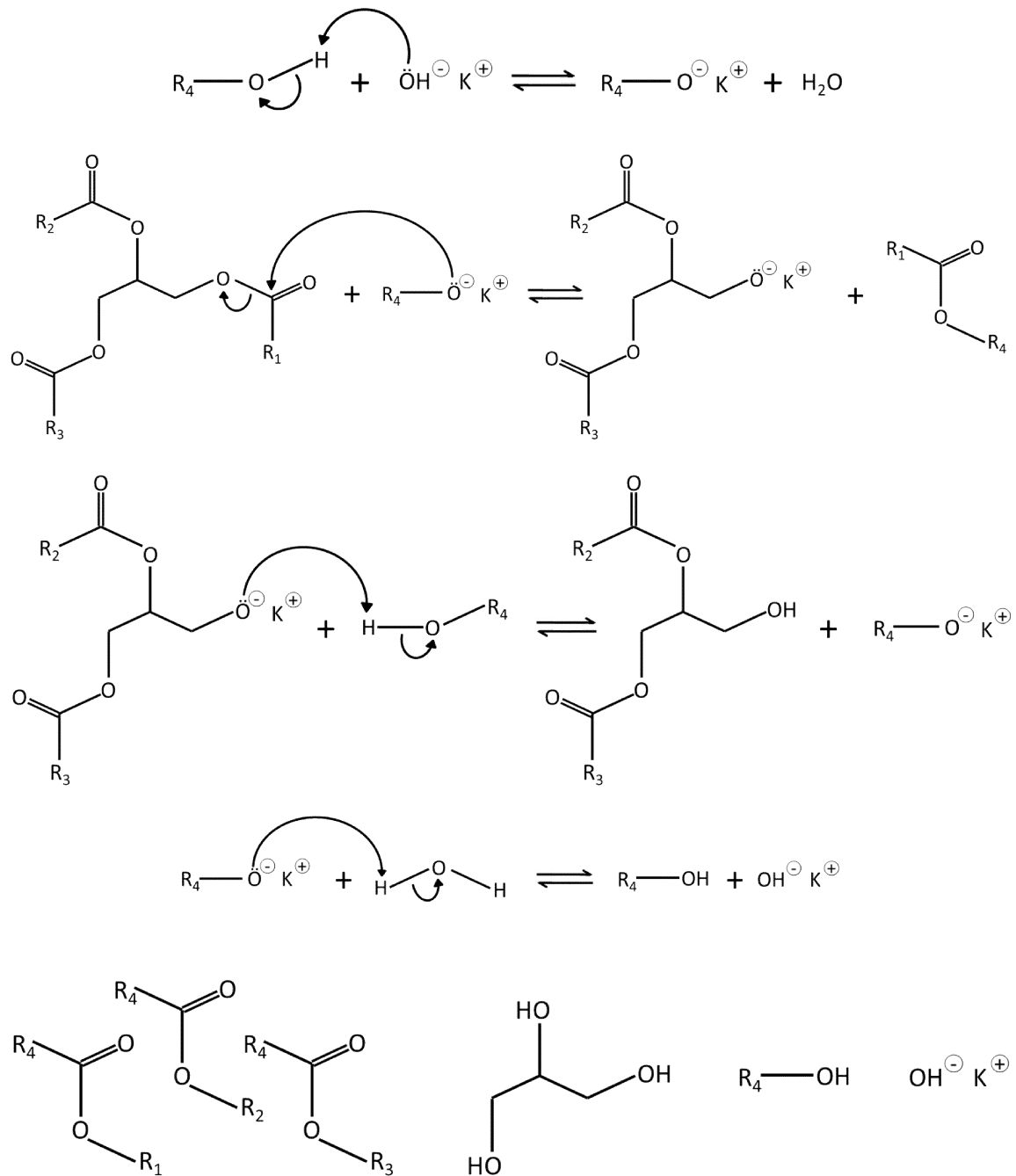
1.1. O Biodiesel

Feito a partir de óleo vegetal, residual ou gordura animal com álcool anidro na presença de um catalisador, o biodiesel foi idealizado por Rudolf Diesel e Henry Ford para o uso em motores de combustão de grandes máquinas, porém somente 50 anos

depois seu processo de produção foi concretizado pelo brasileiro Expedito José de Sá Parente (NAZARENO; VIEIRA; OLIVEIRA, 2015; COSTA, 2019).

A transesterificação homogênea via catálise básica é o processo mais utilizado para a obtenção do biodiesel. Nessa reação representada na Figura 1, ocorre a interação entre os triacilglicerídeos (TAG) constituintes dos óleos vegetais/gorduras e um álcool de cadeia curta na presença de uma base de Brønsted (receptora de prótons) que atua como catalisador, gerando o biodiesel e glicerol. Inicialmente, a base reage com o álcool formando água e o alcóxido correspondente, o alcóxido então ataca o carbono da carbonila do TAG por substituição nucleofílica, gerando um intermediário tetraédrico e um monoéster. O intermediário desprotona o álcool em excesso no meio reacional e forma um novo acilglicerídeo que novamente reage com o alcóxido até que reste somente a molécula de glicerol. Como a reação é reversível, um excesso de álcool é usado para que o equilíbrio se desloque em direção à formação dos produtos (VIEIRA et al., 2017; FATTAH et al., 2020).

Figura 1 - Etapas da reação de transesterificação de um triglicerídeo



Fonte: Adaptado de MITSUTAKE, 2015; COSTA, 2019.

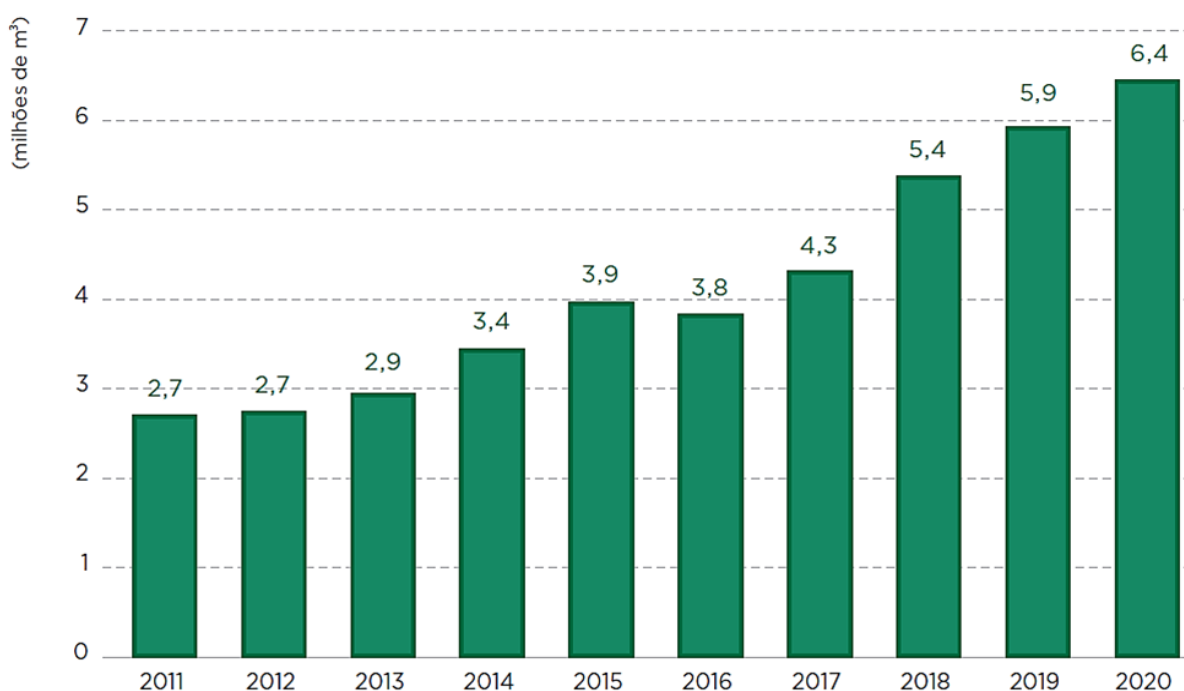
Com o emprego da catálise básica, o uso de reagentes com baixa quantidade de água se faz necessário para evitar a reação paralela de saponificação e o álcool utilizado

na síntese pode ser recuperado ao fim do processo e reutilizado após a sua desidratação (FATTAH et al., 2020).

1.2. O mercado de biodiesel

O último anuário estatístico publicado pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) expõe os números referentes à produção e consumo de biodiesel no Brasil em 2020. A produção de biodiesel puro (B100) apresentou um aumento de 9% em relação a 2019, chegando a 6.432.008,0 m³, o que corresponde a 62,9% da capacidade nominal de produção brasileira e nos coloca como terceiro maior produtor mundial desse combustível (ANP, 2021). A tendência de crescimento observada desde o início da aquisição desses dados em 2011 (com pequeno decréscimo em 2016) conforme a Figura 2, reforça a importância desse mercado para o Brasil, o que consequentemente implica em uma forte necessidade de ferramentas para o controle da qualidade desse combustível.

Figura 2 - Série histórica da produção brasileira de biodiesel



Fonte: ANP, 2021.

1.3. Crambe

A soja é amplamente usada na alimentação humana, o que agrega um alto valor ao seu óleo e aumenta o custo do biodiesel gerado a partir dele. Alternativas como os óleos de palmiste, macaúba, mamona, dendê, mafurra e borra de café vêm sendo estudadas há tempos e dentre eles se destaca o crambe (*Crambe abyssinica Hochst*). O crambe, Figura 3, é uma oleaginosa nativa do continente africano que teve uma excelente adaptação ao solo e ao clima brasileiro. Resistente tanto à geadas quanto à secas, possui uma alta produtividade (entre 1000 e 1500 quilos por hectare), sua cultura é considerada de ciclo curto com média de 90 dias (SITOE et al., 2016; MÁQUINA, 2020).

Figura 3 - (a) Lavoura de crambe e (b) destaque dos frutos



Fonte: Beauty Ambassade., 2022.

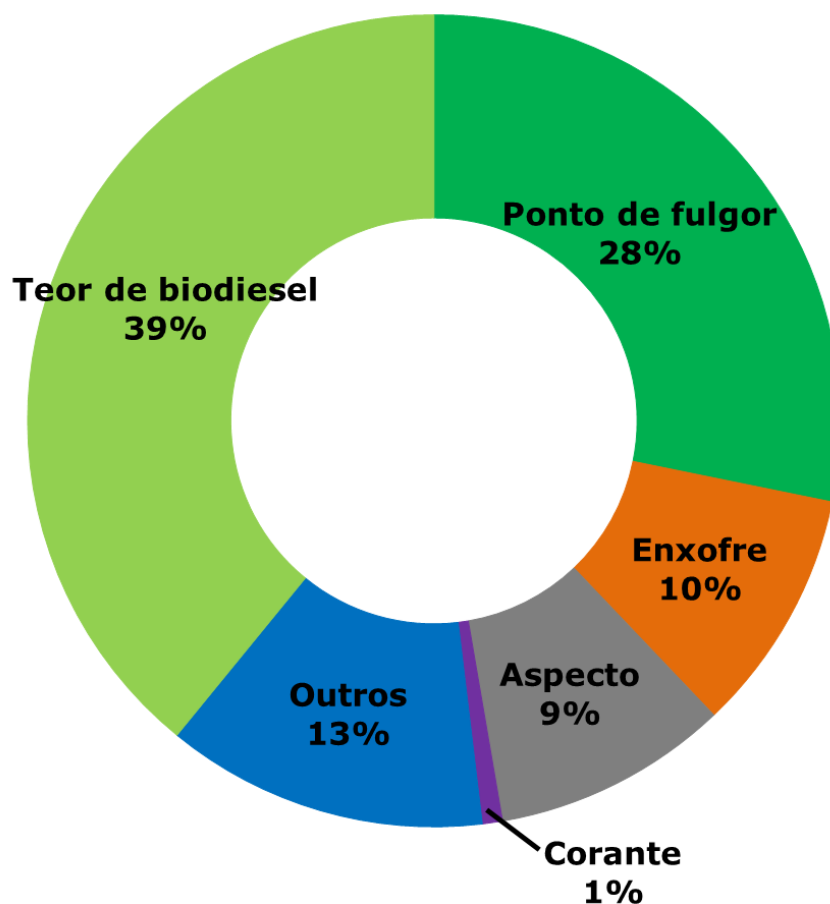
Suas sementes possuem entre 35% e 60% de óleo e a extração tradicionalmente é feita por prensagem e/ou extração com solventes orgânicos, resultando em um óleo com grande teor de ácidos graxos livres, principalmente o ácido úrico (cerca de 60%), que é altamente tóxico e inviabiliza o uso como alimento (MELLO et al., 2017; TAVARES et al., 2017; COSTA, 2019)

1.4. Controle de Qualidade

O diesel combustível vendido no território brasileiro é composto de biodiesel (principalmente feito a partir de óleo de soja e gordura animal) e diesel mineral, atualmente na proporção de $11,0 \pm 0,5\%$ (v/v) biodiesel-diesel (BRASIL, 2016; BRASIL, 2021), a essa mistura é dado o nome de B11. Em março de 2020 a proporção de biodiesel adicionado ao óleo diesel era de $12,0\%$ (v/v), variando para $10,0\%$ (v/v) e estabilizando no valor atual.

Segundo estudo da ANP graficamente apresentado na Figura 4, 39,1% de não conformidades encontradas no diesel comercial estão relacionadas à quantidade de biodiesel na mistura (BRASIL, 2021).

Figura 4 - Registro de não conformidades encontradas no diesel comercial



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2021.

Com constantes variações no percentual da mistura biodiesel-diesel e o fato de ser justamente esse percentual o maior problema encontrado nas ações de fiscalização, fazem-se necessários métodos robustos, reprodutíveis e de resposta rápida para o controle de qualidade desse combustível, como os métodos quimiométricos.

1.5. Quimiometria

Os avanços na instrumentação analítica, gerando dados com muitas variáveis e a popularização dessas medidas gera a necessidade de métodos de estatística multivariada, álgebra matricial e análise numérica para converter a resposta instrumental no dado químico de interesse, assim a quimiometria se define como a parte da química que utiliza ferramentas estatísticas, matemáticas e de lógica formal para obter o máximo de informações a partir da análise de dados químicos (BARROS NETO; SCARMINIO, 2006; BRUNS; FAIGLE, 1985). Os métodos quimiométricos vêm sendo amplamente utilizados para qualificar e\ou quantificar analitos em medicamentos, alimentos, combustíveis, química forense e biomarcadores para doenças (SANTANA; BORGES NETO, POPPI, 2019; COSTA et al., 2020; JIMÉNEZ-CARVELO et al., 2020; CUSTÓDIO et al., 2021; GAUTAM et al., 2021; YANG et al., 2021; MOREIRA et al., 2021; BADDINI et al., 2022), onde se destaca a Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (do inglês PLS-DA) por não ser necessário um conhecimento exato de todos os componentes de uma amostra, realizando a previsão mesmo na presença de interferentes, contanto que esses interferentes também estejam presentes na construção do modelo (BEEBE; KOWALSKI, 1987).

1.5.1. Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) transforma dados complexos visando a facilitação da visualização de informações importantes no conjunto em que se

aplica (MASSART et al., 1998). Os dados são projetados em um subespaço dimensional menor, assim essa análise também é considerada um método de projeção (HERBEGER, 2007).

Na PCA a matriz de resposta instrumental \mathbf{X} é reconstruída em 2 matrizes menores, a matriz de escores (\mathbf{T}) e a de pesos (\mathbf{P}). A parte não modelada corresponde a uma matriz de resíduos (\mathbf{E}). A diminuição de dimensões é obtida através de novas variáveis ortogonais entre si, as componentes principais (do inglês, \mathbf{PC}). As \mathbf{PC} são determinadas baseando-se no critério de variância máxima, deste modo a primeira \mathbf{PC} possui mais informação do que a segunda, a segunda mais que a terceira e assim sucessivamente (MASSART et al., 1998; HERBEGER, 2007).

1.5.2. Quadrados Mínimos Parciais (PLS)

No modelo PLS, a matriz \mathbf{X} (correspondente ao sinal instrumental das amostras) e um vetor \mathbf{y} (correspondente às concentrações do analito de interesse) são incorporados e um processo iterativo, aperfeiçoando ao mesmo tempo a projeção das amostras (\mathbf{X}) sobre os pesos (\mathbf{y}) determinando assim os escores. Essa otimização simultânea provoca pequenas mudanças nas direções dos pesos, os fazendo perder a ortogonalidade e levando a redundâncias que evidenciam a relação linear entre eles. Essas distorções das componentes principais no modelo PLS fazem que não sejam mais \mathbf{PC} e sim, variáveis latentes (\mathbf{VL}) que diferencia este modelo do modelo PCA (BEEBE; KOWALSKI, 1987).

Dois grupos de amostras são usados na construção do modelo: o grupo de calibração, que estabelece a relação entre a resposta instrumental e a propriedade de interesse, criando a equação matemática responsável pela regressão (ou seja, é o modelo em si) e o grupo de previsão, usado para testar o modelo. Para a determinação correta do número de \mathbf{VL} do modelo, se usa o método de validação cruzada, que consiste em usar amostras do grupo de calibração para testar a previsão do modelo antes do grupo de previsão (OTTO, 1999; BORGES NETO, 2005).

1.5.3. Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA)

A Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais é uma variação do método de Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (do inglês, PLS) onde as variáveis da matriz de resposta instrumental \mathbf{X} (matriz espectral) são relacionadas com propriedades de interesse categóricas (discretas ou de classes) presentes em um vetor \mathbf{y} constituído por valores 0 e 1, onde 0 é usado para a classe de não interesse e 1 para a classe de interesse. Idealmente, os valores previstos pelo modelo seriam 0 e 1, mas na prática esses valores são próximos destes, fazendo-se necessário o cálculo de um valor limite para separar as classes baseando-se no teorema de Bayes, denominado *threshold*. Para a construção do modelo PLS-DA procura-se encontrar a menor quantidade de Variáveis Latentes (VL) que descrevam a covariância nas amostras das matrizes e que tenham a correlação máxima com a classe de valores conhecidos (SOUZA, 2018; BENEDETTO et al., 2021).

Diferentes técnicas espectroscópicas e espectrométricas são utilizadas com sucesso para a geração de dados aplicáveis ao modelo PLS-DA, como Infravermelho, UV-vis, Raman, Espectrometria de Massa, Ressonância Magnética Nuclear dentre outras (MÁQUINA et al, 2019; COSTA et al., 2020; JUNQUEIRA et al., 2021; MITSUTAKE et al., 2021; CEBI; ARICI; SAGDIC, 2021).

1.5.4. Validação do modelo PLS-DA

Para a verificação da confiabilidade estatística do modelo PLS-DA construído, além dos Erros Quadráticos Médios (RMSE) de calibração, validação cruzada e previsão, parâmetros conhecidos como Figuras de Mérito apresentados na Tabela 1, são calculadas a partir dos valores obtidos pelo software da modelagem (PLS_Toolbox, versão 8.62) e apresentadas na Tabela de Confusão, que contém: a taxa de Falsos Positivos (FP), compreendida como a probabilidade de uma amostra negativa (não pertencente a classe) ser classificada como uma amostra positiva (pertencente a classe), a taxa de Falsos Negativos (FN) que representa a probabilidade de uma amostra autêntica ser classificada como adulterada, e os valores de Verdadeiros Positivos (TP) e

Verdadeiros Negativos (TN), que possuem raciocínio análogo aos FP e FN. Os parâmetros Sensibilidade e Especificidade verificam a capacidade do modelo em classificar corretamente as amostras TP e TN, respectivamente (XU et al., 2012). O Coeficiente de Correlação de Matthew's (CCM) pode apresentar valores entre -1 e +1, onde o valor +1 representa uma classificação perfeita, 0 representa uma classificação aleatória e -1 uma classificação inversa (SOUZA, 2018; BENEDETTO et al., 2021).

Tabela 1 - Figuras de Mérito empregadas na avaliação do modelo PLS-DA

Designação	Figura de Mérito	Equação
Equação 1	Erros Quadráticos Médios (RMSE)	$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_g} (y_p - y_r)^2}{n_g}} *$
Equação 2	Sensibilidade	$\frac{TP}{TP + FN}$
Equação 3	Especificidade	$\frac{TN}{TN + FP}$
Equação 4	Coeficiente de Correlação de Matthew's (MCC)	$\frac{TP \times TN - FP \times FN}{\sqrt{(TP + FP)(TP + FN)(TN + FP)(TN + FN)}}$

* em que y_p é o valor de concentração da espécie de interesse previsto, y_r o valor real de concentração da espécie de interesse presente na amostra e n_g o número de amostras presentes em cada grupo: de calibração, validação cruzada e previsão.

1.6. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica baseada na medida da absorção de radiação eletromagnética na região entre 4 MHz e 900 MHz (radiofrequência), através da interação do momento angular magnético de um núcleo atômico com um campo magnético induzido (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Considerando que os núcleos atômicos possuem spin nuclear (I), ao qual está associado o vetor momento angular magnético ($\vec{\mu}$), o fenômeno de ressonância ocorrerá quando núcleos alinhados com um campo magnético aplicado (\vec{B}_0) são induzidos a absorver energia e a mudar a orientação de *spin* em relação ao campo aplicado. De acordo com a Equação 5, a absorção de energia é um processo quantizado e a energia absorvida deve ser igual à diferença de energia entre os dois estados de *spin* envolvidos, essa diferença de energia é uma função da intensidade do campo aplicado e, quanto mais forte o campo magnético, maior será a diferença entre os estados de *spin* possíveis (PAVIA et al., 2010).

$$E_{abs} = E_{\beta} - E_{\alpha} = h\nu \quad \text{Equação 5}$$

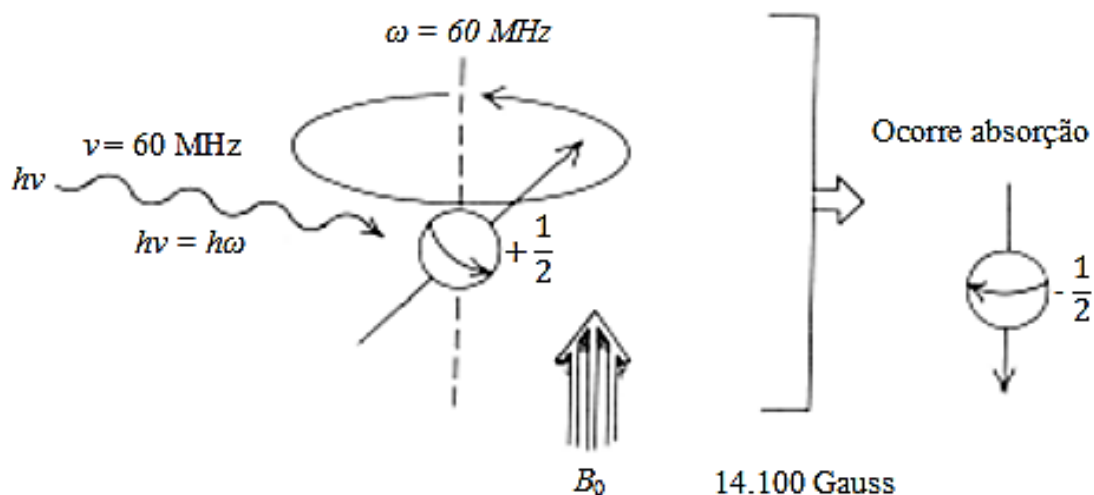
Onde E_{abs} é a energia absorvida, E_{β} corresponde ao estado de menor e E_{α} ao estado de maior energia.

Para que o fenômeno de ressonância magnética nuclear aconteça, o núcleo deve ter *spin* diferente de zero, apresentando assim pelo menos dois estados de energia conforme a Equação 6, deste modo a técnica é comumente aplicada a átomos de ^1H e ^{13}C .

$$n = 2I + 1 \quad \text{Equação 6}$$

Quando o campo magnético é aplicado, o núcleo começa a mudar de direção sobre seu próprio eixo de rotação (movimento de precessão) com frequência angular ω . A frequência com que um próton (considerando o núcleo de ^1H) muda de direção é diretamente proporcional à intensidade do campo e, como o núcleo tem uma carga, a precessão gera um campo elétrico oscilatório de mesma frequência. Se ondas de radiofrequência forem fornecidas ao próton em uma frequência equivalente ao campo elétrico gerado pelo movimento, ocorre o acoplamento dos campos elétrico e magnético e há a transferência das ondas para o núcleo, causando uma mudança de spin (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009), como é representado na Figura 5.

Figura 5 - Técnica aplicada à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear



Fonte: PAVIA et al., 2010.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolver um método de classificação multivariada do teor de biodiesel metílico de crambe em misturas com diesel usando espectroscopia RMN ^1H e Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA).

2.2. Específicos

- 1 – Produzir biodiesel metílico de crambe através da transesterificação básica;
- 2 – Produzir misturas de biodiesel de crambe em diesel na faixa de concentração de 1,0 a 30,0% (v/v);
- 3 – Obter os espectros de RMN ^1H para as misturas;
- 4 – Desenvolver um método para a discriminação de amostras contendo 10,0% (v/v) de biodiesel metílico de crambe em diesel de amostras com teores variantes entre 1,0 a 30,0% (v/v) biodiesel-diesel;
- 5 – Validar o modelo construído.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Produção do biodiesel metílico de crambe

Como o óleo de crambe (*Crambe abyssinica*) geralmente tem alto teor de ácidos graxos livres (AGL) e umidade de água, a síntese do biodiesel foi feita em duas etapas: a esterificação e a transesterificação. A esterificação (catálise ácida) foi realizada para eliminar impurezas e converter os ácidos graxos livres e parte dos triglicerídeos presentes no óleo em ésteres metílicos antes da etapa de transesterificação. Assim, utilizando duas porções de 50 mL, o óleo de crambe passou pelo processo de esterificação na proporção de massas 1:1 (m/m) óleo/álcool metílico mais 0,5% (m/m) de H₂SO₄ em relação ao volume de álcool, em fervura por 120 minutos sob refluxo.

Em seguida, separou-se a fase óleo da catálise e a ela, se adicionou álcool metílico na razão de 30% de sua massa mais 1% (m/m) de hidróxido de potássio. Deixou-se a mistura em agitação por 60 minutos (processo de transesterificação), transferindo-a em seguida para um funil de separação para descanso de 24 horas. Depois do período de descanso, retirou-se a fase glicerol da catálise básica e lavou-se o éster (biodiesel) com três porções de água destilada a 80 °C, por fim levou-se o éster a um evaporador rotativo por 60 minutos, a 80 rpm, pressão de 400 mmHg e 80 °C para a sua secagem.

As quantidades de reagentes, as condições experimentais e os procedimentos para as catálises ácida e básica seguidos para a síntese do biodiesel neste trabalho, foram embasados em trabalhos anteriores do Laboratório de Quimiometria do Triângulo, da Universidade Federal de Uberlândia – MG, onde se aperfeiçoou os processos de obtenção de biodieseis através de métodos de otimização multivariada (PORTELA, 2015).

3.2. Preparação das amostras

As amostras foram construídas usando diesel S10, cedido pela TRANSPETRO S/A, localizada em Uberlândia – MG e o biodiesel preparado no Laboratório de Quimiometria do Triângulo.

Dois grupos de amostras foram preparados: o de não interesse, que se constitui de 38 amostras com teores de biodiesel metílico de crambe variando na faixa de 1,0 a 30,0% (v/v) biodiesel-diesel e o de interesse, formado por 38 amostras com concentração de $10,0 \pm 0,5\%$ (v/v) biodiesel-diesel. Posteriormente, dois conjuntos foram criados, um de calibração contendo 22 amostras de interesse e 22 amostras de não interesse, e um de validação, formado por 16 amostras de cada grupo.

3.3. Aquisição dos espectros de RMN ^1H e construção do modelo PLS-DA

Para a obtenção dos espectros, 90,0 μL de cada amostra foi dissolvida em CDCl_3 (clorofórmio deuterado), totalizando um volume de 600,0 μL que foram lidos no espectrômetro de RMN Bruker, modelo Avance III 400 MHz, utilizando as seguintes condições experimentais: programa de pulso zg30, largura espectral de -3,8374 a 16,1882 ppm, tamanho espectral de 65536 pontos, pulso 90° , tempo de espera de 1 segundo e 16 varreduras. As linhas de base espectrais foram corrigidas manualmente visando a minimização da variação sistemática indesejável.

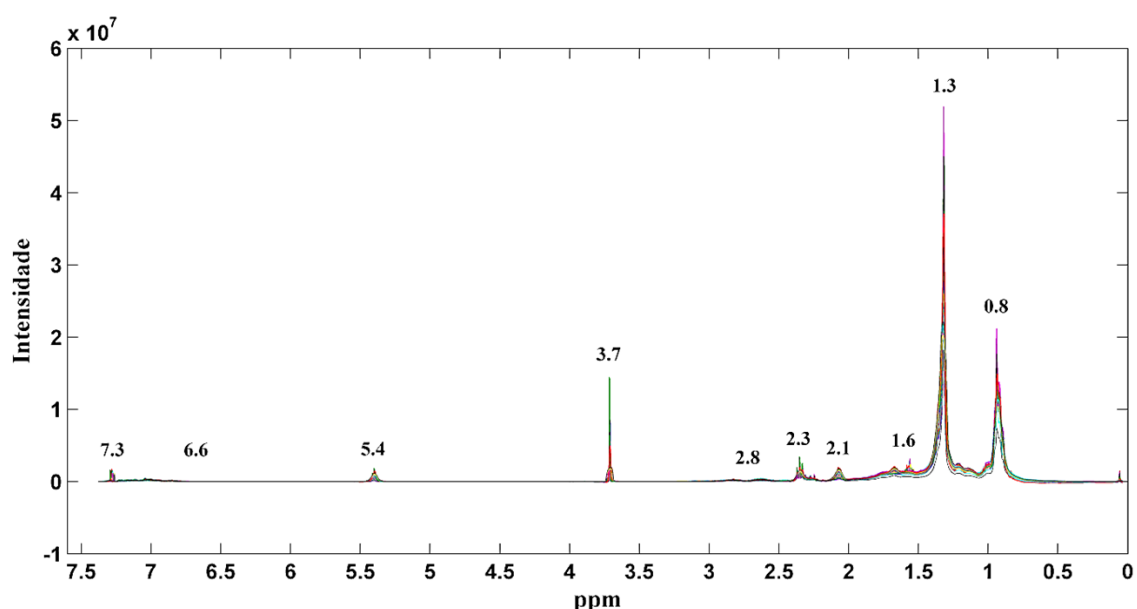
Os dados foram transferidos para ambiente MATLAB, versão R2015b e a matriz final usada na classificação foi obtida depois de um corte na região de interesse espectral. O modelo foi construído usando o PLS_Toolbox, versão 8.62, tendo como pré-processamento os dados centrados na média em ambos os blocos (\mathbf{X} , amostras e \mathbf{y} , vetor classes) e *vanetian blinds cross validation* como método de validação cruzada, com 12 janelas e 1 amostra por janela.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização dos espectros de RMN ^1H

Na Figura 6 é apresentado o conjunto de espectros das 76 amostras das misturas biodiesel metílico de crambe em diesel.

Figura 6 - Espectros de RMN ^1H para as 76 amostras das misturas biosiesel de crambe-diesel



O singlete na região de 0 ppm é atribuído ao tetrametilsilano (TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$) usado como referência nas medições de RMN ^1H (MCMURRY, 2016), o conjunto de picos na região de 0,6 a 3,0 ppm correspondem à hidrogênios alifáticos, sendo: o tripleto perto de 0,8 ppm relacionado à hidrogênios de grupo metila terminal, o sinal forte em 1,3 ppm referente a cadeia de carbono dos metilenos, o multipletto em 1,6 ppm corresponde a prótons metilênicos β -carbonílicos, o tripleto em 2,3 ppm corresponde a prótons metilênicos α -carbonílicos e um sinal associado à insaturação em 2,8 atribuída à bis-alílicos (MCMURRY, 2016; MONTEIRO et al., 2009). Picos característicos de biodieseis com baixa absorção são observados em 3,7 ppm, proveniente da fração do éster metílico, caracterizando prótons metoxílicos e em 5,4 ppm, atribuído à prótons

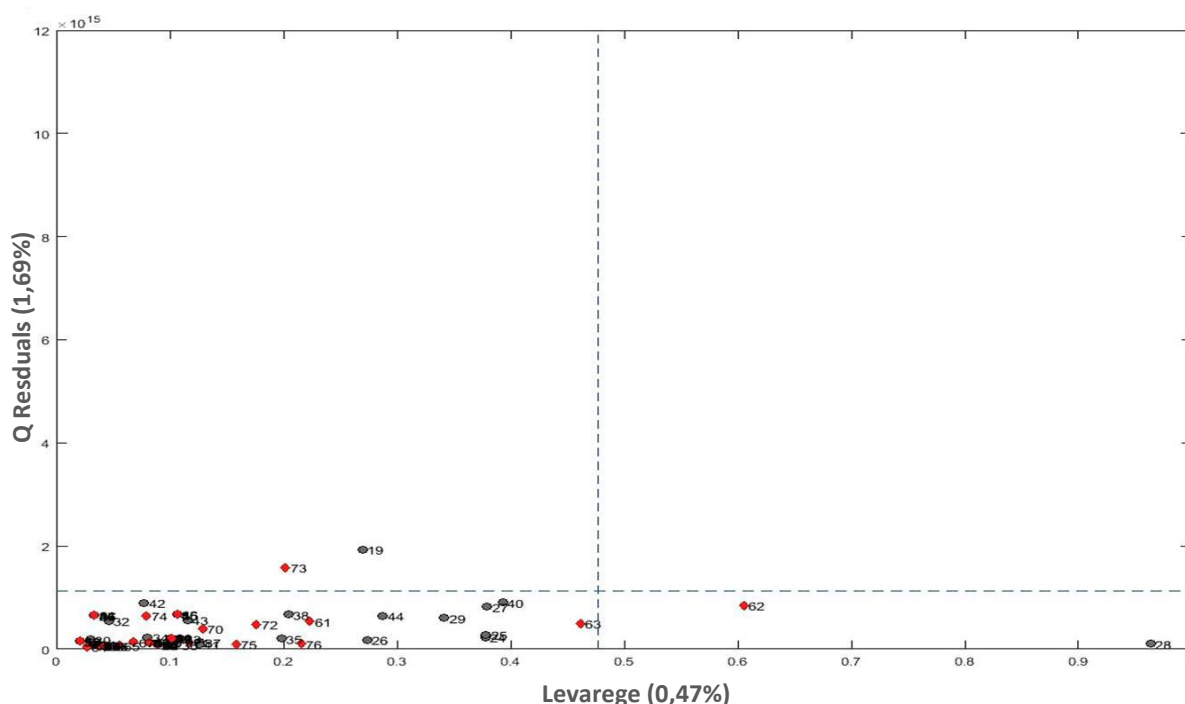
olefínicos. Os picos característicos do diesel são vistos na região de 6,6 a 7,3 ppm e atribuídos à gama de hidrogênios aromáticos (PAVIA et al., 2010; PORTELA et al., 2016).

4.2. Modelo PLS-DA

A quantidade de Variáveis Latentes foi escolhida de modo a se obter o menor valor de Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada (do inglês, RMSECV) e a melhor variância explicada em ambos os blocos. Assim, o modelo foi construído com 7 VL, possuindo variância explicada de 98,31% no bloco **X** e 82,54% no bloco **y**.

A inexistência de amostras anômalas foi verificada pelo gráfico *Leverage* versus *Q Residuals* apresentado na Figura 7, onde amostras que estão fora de ambos os limites (à direita da linha tracejada vertical e acima da linha tracejada horizontal) devem ser retiradas, pois não estão sendo modeladas com eficiência. No conjunto de dados analisados não foram encontradas amostras anômalas, ou seja, todas estão dentro dos limites estatísticos do gráfico.

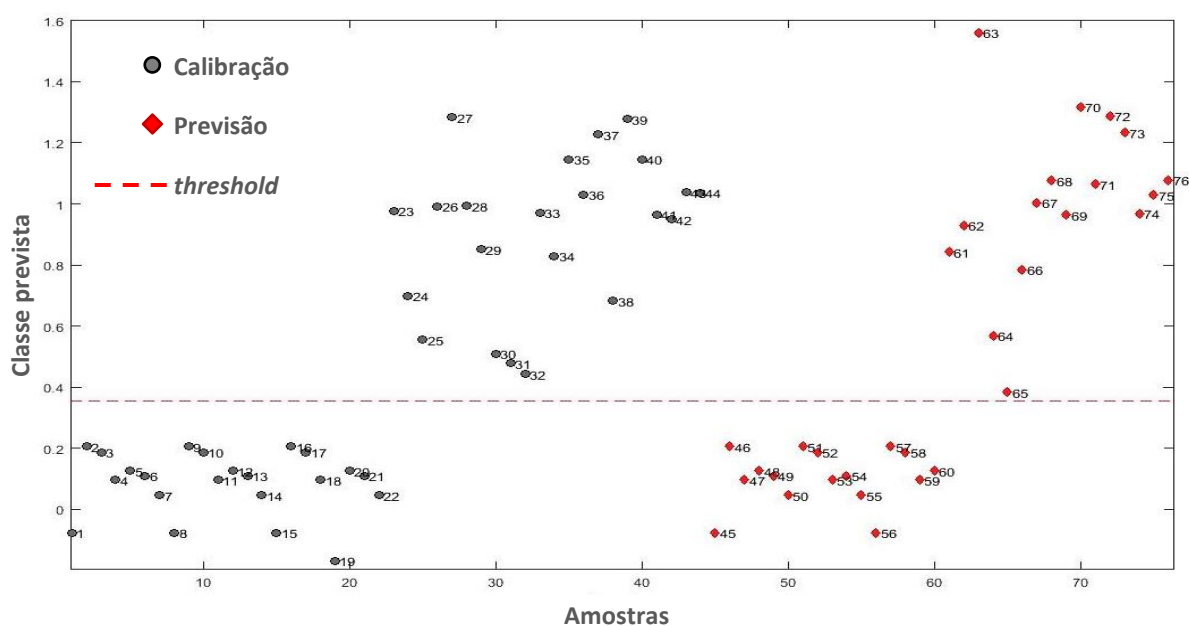
Figura 7 - Gráfico para detecção de amostras anômalas



O modelo de classificação discriminando as amostras contendo $10,0 \pm 0,5\%$ (v/v) biodiesel de crambe em diesel das demais amostras com faixa de concentração entre 1,0 a 30,0% (v/v) biodiesel-diesel foi representado na Figura 8. Com 95% de confiança, a classificação obteve $RMSECV = 1,4\%$ (v/v), Erro Quadrático Médio de Calibração (do inglês, RMSEC) igual a 0,2% (v/v) e Erro Quadrático Médio de Previsão (do inglês, RMSEP) igual a 0,2% (v/v), com *threshold* definido em 0,36.

Podemos observar no gráfico da Figura 8 que todas as amostras do conjunto de calibração (em preto) foram classificadas corretamente, sendo que as da classe de interesse (amostras de B10) estão acima da linha tracejada (*threshold*) enquanto as da classe de não interesse (amostras com teores diferentes de 10,0%) estão abaixo da linha tracejada, como informado no vetor *y* das classes e o modelo identificou esse padrão nas amostras classificadas. O mesmo padrão foi reconhecido pelo modelo PLS-DA nas amostras de previsão (em vermelho). Assim, o modelo PLS-DA construído foi capaz de classificar todas as amostras com 100% de acerto, o que não seria possível realizar por análise visual do conjunto de espectros. Ficando clara a necessidade da aplicação do método quimiométrico para extrair as informações dos dados químicos analisados.

Figura 7 - Modelo PLS-DA discriminando amostras com 10,0% (v/v) de biodiesel metílico de crambe em diesel das amostras com diferentes porcentagens da mistura



4.3. Validação do modelo PLS-DA

A Tabela 2 dispõe as figuras de mérito avaliadas para o modelo de classificação construído, o validando. Todas as amostras foram classificadas em suas classes corretamente e o valor positivo do Coeficiente de Matthew's indica que a classificação foi executada corretamente.

Tabela 2 - Tabela de Confusão do modelo PLS-DA

Figura de Mérito	Valor
Verdadeiro Positivo	1,0
Falso Positivo	0,0
Verdadeiro Negativo	1,0
Falso Negativo	0,0
Sensibilidade	1,0
Especificidade	1,0
Coeficiente de Matthew's	1,0

5. CONCLUSÃO

As semelhanças dos espectros de RMN ^1H das misturas biodiesel-diesel independente da porcentagem dificultam a atribuição do valor de concentração para cada perfil espectral, deste modo, os métodos quimiométricos surgem como alternativa para o monitoramento visual no controle de qualidade do diesel comercial.

O método desenvolvido usando a técnica de espectroscopia RMN ^1H aliada à Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais se mostrou assertivo para a classificação dos teores de biodiesel metílico de crambe em misturas com diesel, discriminando corretamente amostras de concentração igual a $10,0 \pm 0,5\%$ (v/v) mesmo na presença de outras amostras com concentrações próximas.

Para acompanhar a variação regulamentada pela ANP da concentração de biodiesel na mistura com diesel, basta trocar a classe de interesse, mantendo a aplicabilidade método desenvolvido.

6. REFERÊNCIAS

BADDINI, A. N. Q.; PAULA SANTOS, J. L. V.; TAVARES, R.R.; PAULA, L. S.; ARAÚJO FILHO, H. C.; FREITAS, R. P. PLS-DA and data fusion of visible Reflectance, XRF and FTIR spectroscopy in the classification of mixed historical pigments. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 265, 2022.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Quimica Nova**, v. 29, p. 1401-1406, 2006.

BEEBE, K. R.; KOWALSKI, B. R. An Introduction to Multivariate Calibration and Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 1007A-1017A, 1987.

BENEDETTO, A.; PEZZOLATO, M.; ROBOTTI, E.; BIASIBETTI, E.; POIRIER, A.; DERVILLY, G.; LE BIZEC, B.; MARENGO, E.; BOZZETTA, E. Profiling of transcriptional biomarkers in FFPE liver samples: PLS-DA applications for detection of illicit administration of sex steroids and clenbuterol in veal calves. **Food Control**, v. 128, 2021.

BORGES NETO, W. **Parâmetros de qualidade de lubrificantes e óleo de oliva através de espectroscopia vibracional, calibração multivariada e seleção de variáveis**. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP: 2005.

Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2021 / Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. - Rio de Janeiro: ANP, 2008. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-deconteudo/publicacoes/anuario-estatistico/arquivos-anuario-estatistico-2021/anuario-2021.pdf>>. Acesso: 16 mar. 2022.

BRASIL. **Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016**. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Diário Oficial da União, Brasília. 2016.

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. QUIMIOMETRIA. **Quimica Nova**, p. 84-98, 1985.

CEBI, N.; ARICI, M.; SAGDIC, O. The famous Turkish rose essential oil: Characterization and authenticity monitoring by FTIR, Raman and GC–MS techniques combined with Chemometrics. **Food Chemistry**, v. 354, 2021.

COSTA, L. G.; **QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES DE BIODIESEL DE CRAMBE E MAFURRA EM MISTURAS COM DIESEL UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA MIR E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS**. Monografia (Graduação em Química Industrial) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG: 2019a.

COSTA, L. G.; SITOE, B. V.; SANTOS, D. Q.; BORGES NETO, W. **QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE BIODIESEL DE CRAMBE EM MISTURAS COM DIESEL UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA MIR E SELEÇÃO DE VARIÁVEIS**. **Quimica Nova**, v. 43, p. 723-728, 2020.

MÁQUINA, Ademar Domingos Viagem. Determinação do teor de biodiesel de Mafurra e Crambe em misturas com diesel por RMN de ¹H e regressão multivariada por OPLS E OPLS-DA. 2020. 93 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.453>

CUSTÓDIO, M. F.; MAGALHÃES, L. O.; ARANTES, L. C.; BRAGA, J. W. B. Identification of Synthetic Drugs on Seized Blotter Papers Using ATR-FTIR and PLS-DA: Routine Application in a Forensic Laboratory. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 513-522, 2021.

FATTAH, I. M. R.; ONG, H. C.; MAHLIA, T. M. I.; MOFIJUR, M.; SILITONGA, A. S.; RAHMAN, S. M. A.; AHMAD, A. State of the Art of Catalysts for Biodiesel Production. **Frontiers in Energy Research**, v. 8, p. 1-17, 2020.

GAUTAM, R.; CHAUHAN, R.; KUMAR, R.; SHARMA, V. PLS-DA and infrared spectroscopy based rapid and non-destructive discrimination of black ball and gel pen inks for forensic application. **Forensic Science International: Reports**, v. 3, 2021.

HERBERGER, K. **Chemoinformatics-multivariate mathematical-statistical methods for data evaluation**. In: Vékey, C.; Takes, A.; Vertes, A. (Ed.). *Medical Applications of Mass Spectrometry*, 1 ed. Amsterdam, cap. 7, Ed. Elsevier, 2007.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6a ed. Porto Alegre, Brasil: Bookman, 2009.

JIMÉNEZ-CARVELO, A. M.; MARTÍN-TORRESA, S.; ORTEGA-GAVILÁN, F.; CAMACHO, J. PLS-DA vs sparse PLS-DA in food traceability. A case study: Authentication of avocado samples. **Talanta**, 2020.

JUNQUEIRA, J. G. M.; DO NASCIMENTO, M. N. G.; DA COSTA, L. G.; ROMUALDO, L. L.; DE AQUINO, F. W. B.; ABUBAKAR, M. N.; TEREZAN, A. P.; CUNHA, G. S.; SEVERINO, V. G. P. In vivo and in vitro Volatile Constituents of the Flowers of *Xylopia aromatica* by HS-SPME/GC-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 1111-1119, 2021.

KONUR, O. (ed.). **Biodiesel Fuels: Science, Technology, Health, and Environment**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2021.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; BUYDENS, L. M. C.; DE JONG, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-VERBEKE, J. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A**. Elsevier: Amsterdam, 1998.

MCMURRY, J. **Química Orgânica**. 9ª ed. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2016.

MELLO, B. T. F.; GONCALVES, J. E.; RODRIGUES, G. M.; CARDOZO FILHO, L.; SILVA, C. Hydroesterification of crambe oil (*Crambe abyssinica* H.) under pressurized conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 110-119, 2017.

MITSUTAKE, H. **Uso de espectroscopia no infravermelho médio e cartas de controle multivariadas no monitoramento da qualidade de biodieseis de soja e fritura residual em misturas com diesel**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG: 2015.

MITSUTAKE, H.; RODRIGUES DA SILVA, G. H.; RIBEIRO, L. N. M.; PAULA, E.; POPPI, R. J.; RUTLEDGE, D. N.; BREITKREITZ, M. C. Raman Imaging and Chemometrics Evaluation of Natural and Synthetic Beeswaxes as Matrices for Nanostructured Lipid Carriers Development. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, p. 116-130, 2021.

MONTEIRO, M. R. et al. Determination of biodiesel blend levels in different diesel samples by ¹H NMR. **Fuel**, v. 88, n. 4, p. 691–696, 2009.

MOREIRA, M. A. B. et al. Chemical Profile and Chemometric Analysis of Genetically Modified Soybeans Produced in the Triângulo Mineiro Region (MG), Brazil. **Journal of Agricultural Studies**, v. 9, 2021.

NAZARENO, J. C.; OLIVEIRA, G.G.; VIEIRA, G.E.G. Aproveitamento do Dendê para Produção de Biodiesel na Região Amazônica Brasileira. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 5, p. 1-10, 2015.

OTTO, M. **Chemometrics** – Statistics and Computer application in Analytical Chemistry, Wiley, 1999.

MÁQUINA, A. D. V. et al. Quantification and classification of cotton biodiesel content in diesel blends, using mid-infrared spectroscopy and chemometric methods. **Fuel**, v. 237, n. September 2018, p. 373–379, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.10.011>

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução da 4ª edição norte-americana. 4ª ed. São Paulo: CENGAGE Learning, 2010.

PORTELA, F. M. **Produção de biodieseis etílico e metílico de pinhão-manso usando diferentes rotas catalíticas**. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG: 2015.

PORTELA, N. A. et al. Quantification of biodiesel in petroleum diesel by ¹H NMR: Evaluation of univariate and multivariate approaches. **Fuel**, v. 166, p. 12–18, 2016.

SANTANA, F. B.; BORGES NETO, W.; POPPI, R. J. Random Forest as One-Class Classifier and Infrared Spectroscopy for Food Adulteration Detection. **Food Chemistry**, 2019.

SITOE, B. V. et al. Quality Control of Biodiesel Content of B7 Blends of Methyl Jatropha and Methyl Crambe Biodiesels Using Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Control Charts Based on Net Analyte Signal. **Energy Fuels**, v. 30, p. 1062–1070, 2016.

SOUZA, L. M. **Controle de qualidade de óleos de linhaça e ginkgo biloba usando espectrometria no infravermelho médio e ferramentas quimiométricas**. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG: 2018.

TAVARES, G. R., MASSA, T. B., GONÇALVES, J. E., SILVA, C., SANTOS, W. D. Assesment of ultrasound-assisted extraction of crambe seed oil for biodiesel synthesis by in situ interesterification. **Renewable Energy**, n. 111, p. 659-665, 2017.

VIEIRA, J. S. C.; SOUSAB, T. L.; ROSASB, L. S.; LIMAC, A. L.; RONCONID, C. M.; MOTA, C. J. A. ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO HOMOGÊNEA DE ÓLEOS VEGETAIS CONTENDO ALTO TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES. **Quimica Nova**, v. XY, n. 0, p. 1-7, 2017.

XU, L. et al. Rapid discrimination of pork in Halal and non-Halal Chinese ham sausages by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and chemometrics. **Meat Science**, v. 92, n. 4, p. 506–510, dez. 2012.

YANG, C.; GUANG, P.; LI, L.; SONG, H.; HUANG, F.; LI, Y.; WANG L.; HU, J. Early rapid diagnosis of Alzheimer's disease based on fusion of near- and mid-infrared spectral features combined with PLS-DA. **International Journal for Light and Electron Optics**, 2021.